

# **Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen/- extrakten und Kaffeegetränken *in vitro* und bei Probanden**

Dem Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen  
Universität Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
eingereichte Dissertation

D 386

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin Tamara Bakuradze

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.04.2010

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2010

*Meiner Familie*

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Mai 2006 und August 2009 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.04.2010

Prüfungskommission Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Frau Dr. C. Janzowski für die Überlassung des Themas, sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 OXIDATIVER STRESS.....</b>	<b>6</b>
3.1.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)	6
3.1.2 FOLGEN VON OXIDATIVEM STRESS	10
3.1.2.1 DNA Schäden	10
3.1.2.2 Lipidperoxidation (LPO) und Proteinoxidation	13
<b>3.2 ANTIOXIDATIVE ABWEHRMECHANISMEN .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 PRIMÄRE ENDOGENE ABWEHR	15
3.2.2 SEKUNDÄRE ENDOGENE ABWEHR	18
3.2.3 ANTIOXIDATIVE RESPONSE ELEMENT (ARE)	19
3.2.3.1 NAD(P)H:Chinon-oxidoreduktase (NQO1)	21
3.2.3.2 $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL)	22
3.2.3.3 Glutathionreduktase (GSR)	23
3.2.3.4 Hämoxygenase	25
<b>3.3 KAFFEE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 KAFFEINHALTSSTOFFE UND IHRE BIOLOGISCHE WIRKUNGEN .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 PHENOLSÄUREN IM KAFFEE	30
3.4.1.1 Bioverfügbarkeit der Chlorogensäuren	31
3.4.2 ABBAUPRODUKTE DER CHLOROGENSÄURE	33
3.4.3 ANTIOXIDATIVE WIRKUNG DER PHENOLSÄUREN	35
3.4.4 BIOLOGISCHE WIRKUNG VON PHENOLSÄUREN	36
3.4.5 ALKALOIDE IM KAFFEE	38
3.4.5.1 Trigonellin	39
3.4.5.2 N-Methylpyridinium (NMP) und Abbauprodukte	40
<b>3.5 KAFFEEEXTRAKTE .....</b>	<b>43</b>
<b>3.6 STUDIENKAFFEES .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7 TESTMETHODEN .....</b>	<b>45</b>
3.7.1 ZELLSYSTEME	45
3.7.1.1 HT-29 Zellen	45
3.7.1.2 Caco-2 Zellen	46
3.7.1.3 Blut	46
3.7.2 INDUKTION VON MODERATEN OXIDATIVEN STRESS	48
3.7.2.1 Menadion	48
3.7.2.2 tert-Butylhydroperoxid (TBH)	50
3.7.3 DETEKTION (OXIDATIVER) DNA-SCHÄDIGUNG (COMET ASSAY)	51
3.7.4 BESTIMMUNG DES ROS-LEVEL (DCF-ASSAY)	53
3.7.5 GLUTATHIONBESTIMMUNG (PHOTOMETRISCHER ASSAY)	55
3.7.6 PROTEINEXPRESSION (WESTERN BLOT)	56
3.7.7 BESTIMMUNG DER DIREKTEN ANTIOXIDATIVEN AKTIVITÄT (PHOTOMETRISCHER ASSAY)	58
3.7.7.1 Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC (SET)	58
3.7.7.2 Oxygen radical absorbing capacity, ORAC (HAT)	59
3.7.8 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER WASSERSTOFFPEROXID (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-KONZENTRATION (FOX1-ASSAY)	60
3.7.9 ERFASSUNG VON KÖRPERGEWICHT /-GRÖÖE UND KÖRPERZUSAMMENSETZUNG	62
<b>4. MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>64</b>

<b>4.1 ZELLKULTUR.....</b>	<b>64</b>
4.1.1 MATERIALIEN .....	64
4.1.2 KULTIVIERUNG .....	65
4.1.2.1 Mediumwechsel .....	65
4.1.2.2 Subkultivierung .....	65
4.1.2.3 Einfrieren von Zellen .....	66
4.1.2.4 Auftauen von Zellen .....	66
<b>4.2 ZELLINKUBATION .....</b>	<b>67</b>
4.2.1 MATERIALIEN .....	67
4.2.2 SUBSTANZEN .....	67
4.2.3 ZELLINKUBATIONEN FÜR DEN COMET ASSAY, WESTERN BLOT UND DCF-ASSAY .....	68
<b>4.3 VIABILITÄTSBESTIMMUNG.....</b>	<b>69</b>
4.3.1 ZELLZAHLBESTIMMUNG .....	69
4.3.2 BESTIMMUNG DER VIABILITÄT .....	69
<b>4.4 GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER BLUTPROBEN .....</b>	<b>70</b>
4.4.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	70
4.4.2 BLUTENTNAHME .....	71
4.4.3 VOLLBLUT .....	71
4.4.4 PLASMA GEWINNUNG .....	71
4.4.5 URINPROBEN .....	71
<b>4.5 EINZELZELLGELELEKTROPHORESE (COMET ASSAY).....</b>	<b>72</b>
4.5.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	72
4.5.2 DURCHFÜHRUNG .....	73
<b>4.6 DICHLORFLUORESCEIN (DCF)-ASSAY .....</b>	<b>74</b>
4.6.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	74
4.6.2 DURCHFÜHRUNG .....	75
<b>4.7 GLUTATHIONBESTIMMUNG .....</b>	<b>76</b>
4.7.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	76
4.7.2 DURCHFÜHRUNG .....	78
4.7.2.1 Messung von tGSH (Glutathionspiegel) .....	78
4.7.2.2 Messung von GSSG .....	79
<b>4.8 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....</b>	<b>80</b>
4.8.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	80
4.8.2 DURCHFÜHRUNG .....	80
<b>4.9 SDS-GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT .....</b>	<b>81</b>
4.9.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	81
4.9.2 DURCHFÜHRUNG .....	84
4.9.2.1 Probenaufarbeitung.....	84
4.9.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	84
4.9.2.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper.....	85
<b>4.10 TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC) .....</b>	<b>87</b>
4.10.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN, LÖSUNGEN .....	87
4.10.2 DURCHFÜHRUNG .....	88
<b>4.11 OXIGEN RADICAL ABSORPTION CAPACITY (ORAC) .....</b>	<b>89</b>
4.11.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	89
4.11.2 DURCHFÜHRUNG .....	90
<b>4.12 WASSERSTOFFPEROXID (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)- BESTIMMUNG.....</b>	<b>92</b>
4.12.1 GERÄTE, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND LÖSUNGEN .....	92
4.12.2 DURCHFÜHRUNG .....	93
<b>4.13 ERFASSUNG VON KÖRPERGEWICHT/-GRÖÖE UND KÖRPERZUSAMMENSETZUNG .....</b>	<b>93</b>
4.13.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	93
4.13.2 DURCHFÜHRUNG .....	94
<b>4.14 INTERVENTIONSTUDIEN AN PROBANDEN.....</b>	<b>95</b>
4.14.1 ERSTE HUMANSTUDIE (PILOTSTUDIE) .....	95
4.14.2 ZWEITE HUMANSTUDIE .....	96

4.14.2.1 Durchführung der 2. Humanstudie .....	96
<b>4.15 STATISTIK .....</b>	<b>100</b>
SIGNIFIKANZEN .....	100
4.15.1 AUSREIßER-TEST (NALIMOV) .....	101
4.15.2 ANDERSON-DARLING TEST .....	101
4.15.3 PARAMETRISCHE TESTS: T-TEST .....	102
4.15.4 WILCOXON-TEST .....	103
4.15.5 ANOVA .....	104
 <b>5. <u>ERGEBNISSE UND ERSTE DISKUSSION</u>.....</b>	<b>106</b>
 <b>5.1 IN VITRO UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>106</b>
5.1.1 ZELLFREIE ANTIOXIDATIVE AKTIVITÄT DER KAFFEEEXTRAKTE UND INHALTSSTOFFE .....	106
5.1.2 PRÜFUNG AUF EXTRAZELLULÄRE GENERIERUNG VON WASSERSTOFFPEROXID UND DESSEN EINFLUSS AUF DEN ZELLULÄREN ROS-LEVEL .....	110
5.1.3 MODULATION TBH-INDUZIERTEN ROS-LEVEL .....	113
5.1.4 MODULATION VON OXIDATIVEN DNA-SCHÄDEN .....	116
5.1.5 EXPRESSION ARE-ABHÄNGIGER ENZYME .....	118
<b>5.2 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER IN VITRO ERGEBNISSE .....</b>	<b>123</b>
<b>5.3 PILOTINTERVENTIONSSTUDIE AN PROBANDEN .....</b>	<b>127</b>
5.3.1 MODULATION OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN IM VOLLBLUT .....	127
<b>5.4 ZWEITE HUMANSTUDIE AN PROBANDEN .....</b>	<b>130</b>
5.4.1 COMPLIANCE .....	130
5.4.2 ENTWICKLUNG VON KÖRPERGEWICHT UND KÖRPERZUSAMMENSETZUNG .....	131
5.4.3 ENERGIE- UND NÄHRSTOFFAUFNAHME .....	133
5.4.4 MODULATION DER BIOMARKER .....	137
5.4.4.1 DNA-Schäden .....	137
5.4.4.2 Glutathionspiegel (tGSH) und Glutathionstatus.....	139
5.4.5 EINFLUSS UNABHÄNGIGER VARIABLEN AUF DIE MESSPARAMETER .....	142
5.4.6 DISKUSSION DER WIRKSAMKEIT DES STUDIENKAFFEES .....	143
 <b>6. <u>DISKUSSION UND AUSBLICK</u>.....</b>	<b>146</b>
 <b>7. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....</b>	<b>156</b>
 <b>8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u> .....</b>	<b>158</b>
 <b>9. <u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u> .....</b>	<b>171</b>
 <b>10. <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>.....</b>	<b>174</b>
 <b>11. <u>ANHANG</u>.....</b>	<b>178</b>
 11.1 IN VITRO DATEN.....	178
11.2 PROBANDENDATEN.....	184
11.3 LEBENS LAUF .....	192
POSTERBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN .....	195

## 1. Einleitung

Mit einer durchschnittlichen Aufnahme von 148 Litern im Jahr [Kaffeeverband] zählt Kaffee zu den populärsten und am häufigsten konsumierten Getränken weltweit. Neben dem angenehmen Aroma und Geschmack des Kaffees spielt dabei auch die anregende Wirkung durch das im Kaffee in größeren Mengen enthaltene Koffein eine bedeutende Rolle [Higdon and Frei, 2006; Somoza *et al.*, 2003]. Kaffee wirkt nicht nur belebend, indem er das zentrale Nervensystem und die Hormonausschüttung anregt, sondern auch die Atmung und die Durchblutung stimuliert [Vormann, 2009]. Kaffee ist eine komplexe Mischung aus über tausend verschiedenen Substanzen, von denen einige eine biologische Aktivität besitzen: Es konnten unter anderem antioxidative, antikarzinogene und antimutagene Eigenschaften beobachtet werden. Neuere epidemiologische Studien deuten auf ein gesundheitsförderndes und gewichtsreduzierendes Potential des Kaffees hin, welches mit dem hohen Gehalt an Antioxidantien in Verbindung gebracht wird. So wird ein moderater Kaffeeconsum von 3-4 Tassen pro Tag mit einem verminderten Risiko für chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 [Greenberg *et al.*, 2006; van Dam and Hu, 2005], Parkinson'sche Krankheit, Lebererkrankungen wie Leberzirrhose und Leberkarzinom, Alzheimer [Arendash *et al.*, 2006] und kardiovaskuläre Krankheiten [Olthof *et al.*, 2001] assoziiert. Bei der Pathogenese jeder dieser Erkrankungen wurde eine erhöhte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt. Zu den ROS gehören freie Radikale, wie das Hydroxyl- und Superoxidanion-Radikal, aber auch neutrale Moleküle wie Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Diese reaktiven Moleküle sind in der Lage, direkt oder indirekt zelluläre Bestandteile wie Lipide, DNA oder Proteine zu schädigen und haben daher adverse Effekte für den Organismus. Aus diesem Grund hat die Aufnahme antioxidativ wirksamer Substanzen aus Kaffeegetränken eine große Bedeutung zur Prävention gegenüber Krankheiten, die mit der Entstehung von oxidativem Stress im Organismus assoziiert sind. Antioxidantien können ROS durch das Abfangen von Radikalen oder durch Inaktivierung redoxaktiver Übergangsmetalle oder Modulation der Zellantwort beseitigen. Zwar wurde im Rahmen von Interventionsstudien an gesunden Probanden bereits gezeigt, dass Kaffeeconsum zu einer verbesserten antioxidativen Kapazität im Blut führt [Natella *et al.*, 2002], jedoch ist noch ungeklärt, welche Inhaltsstoffe des Kaffeegetränks in welchem Ausmaß zu einer Verbesserung der antioxidativen Kapazität im

Organismus beitragen. Zu den Antioxidantien im Kaffee zählen eine Vielzahl meist polyphenolischer Verbindungen, z.B. Chlorogensäuren als quantitativ dominierende Polyphenole, für die antioxidative Aktivitäten nachgewiesen wurden [Bekedam *et al.*, 2008; Olthof *et al.*, 2001; Thom, 2007] [Higdon and Frei, 2006]. Allerdings sinkt der Chlorogensäuregehalt des Kaffees mit zunehmendem Röstgrad ab [Bekedam *et al.*, 2008], während die antioxidative Wirksamkeit des Kaffeegetränks erhalten bleibt bzw. sogar erhöht wird [del Castillo *et al.*, 2005]. Dies wird auf Bildung antioxidativ wirksamer Chlorogensäure-Abbauprodukte sowie Melanoidine zurückgeführt, die während des Röstprozesses gebildet werden [del Castillo *et al.*, 2002; Farah *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2006]. Zu diesen Substanzen gehört auch das erst kürzlich identifizierte und auf der Basis von einer Tierstudie als antioxidativ wirksam beschriebene Röstprodukt N-Methylpyridinium. Bisher wurden jedoch noch keine struktur-wirkungsbasierte Nachweise im Rahmen von Humanstudien erbracht [Somoza *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2002a].

Die Frage inwieweit phenolische- und während des Röstens gebildete Verbindungen auch bei Konsum von Kaffee wirken, ist derzeit noch nicht geklärt. Für eine Beurteilung der gesundheitsfördernden Relevanz der Kaffee bzw. Kaffeeinhaltsstoffe sind weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen erforderlich.



## 2. Problemstellung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der BMBF-Initiative „Funktionelle Ernährungsforschung“ zum Projekt „Gesundheitskaffee: Charakterisierung, Optimierung und Prüfung antioxidativer Effektivität“ mit den Forschungspartnern AG Eggers, TU Hamburg-Harburg; AG Marko, TU Karlsruhe; AG Hofmann, TU München und AG Somoza, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching. Ziel dieses Projektes ist der wissenschaftlich-fundierte Nachweis einer antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen, sowohl in humanen Zelllinien als auch im menschlichen Organismus. In den dazu durchgeführten Untersuchungen werden die Wirksamkeit der identifizierten Antioxidantien, ihre Metabolisierung und Bioverfügbarkeit untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten sowie Kaffeegetränken hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirksamkeit. Die Arbeit gliedert sich in einen *in vitro* Teil, in dem an Kolonkarzinomzelllinien die antioxidative Aktivität von Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten vergleichend untersucht wurde, und einen zweiten Teil, der die Untersuchung der Wirkung aktivitätsoptimierter Kaffeegetränke auf den menschlichen Organismus beinhaltet. Neben der Identifizierung der antioxidativen Eigenschaften von Kaffeegetränken, wurde eine gewichtsregulierende Wirkung des Kaffees an gesunden Probanden untersucht.

- Die ***in vitro*** Untersuchungen hatten die Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe und –extrakte zum Ziel. Zur Bestimmung der direkten antioxidativen Aktivität wurden zellfreie Tests (**TEAC und ORAC**) herangezogen. Diese erlauben eine Beurteilung der direkten antioxidativen Eigenschaften und ermöglichen einen Vergleich der Substanzen hinsichtlich Wirkstärke und -mechanismus. Durch diese Tests lässt sich aber nur schwer abschätzen, inwieweit eine antioxidative Wirkung auch im Organismus eine Rolle spielen könnte. Daher wurden zur Erfassung dieses Potentials verschiedene biologische Marker ausgewählt die im direkten Zusammenhang mit oxidativer Zellschädigung stehen. Dies umfasste zum einen die Modulation (**oxidativer**) **DNA-Schäden** mittels Comet Assay und zum anderen des **zellulären ROS-Levels** mittels DCF Assay. Da eine Modulation des ohnehin geringen Basisschadens der Zelle nur schwer quantifizierbar war, wurde ein **zweistufiges Inkubationsprotokoll**, basierend auf einer Vorinkubation mit den potenziellen Antioxidantien, gefolgt von einer

Oxidansbehandlung (zur Erhöhung des Schädigungsausmaßes), verwendet. Die Modulation der Zellantwort wurde durch die Veränderungen der **Proteinexpression der ARE-abhängigen Enzyme** NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1(NQO1),  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL) und Glutathion-reduktase (GSR) mittels Western Blot untersucht, da Antioxidantien die Proteinexpression antioxidativer und detoxifizierender Abwehrsysteme über AREs aktivieren können. Diese zelluläre Assays wurden in den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und Caco-2 durchgeführt, da diese Zellsysteme trotz einiger Unterschiede zu normalen Darmepithelzellen bis heute das Model der Wahl zur Untersuchung des intestinalen Transports sind. Die Verwendung verschiedener Zellsysteme ermöglicht eine Aussage über die biologische Wirksamkeit der Antioxidantien; dies ist auch im Hinblick auf die Übertragung auf das *in vivo*-System von Bedeutung.

Viele Arbeiten belegen, dass polyphenolische Bestandteile unter Zellkulturbedingungen im Medium hohe Mengen an Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) generieren können [Long and Halliwell, 2001], was auf zelluläre Mechanismen einen Einfluss nehmen könnte. Für die korrekte Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen und -extrakten ist es daher notwendig diese prooxidative Eigenschaft zu erfassen bzw. auszuschließen. Die Prüfung auf die **Generierung von  $H_2O_2$**  erfolgte mittels **FOX-1 Assay**, mit dem die  $H_2O_2$ -Konzentration in wässrigen Lösungen quantifiziert werden kann. Um die „artifizielle“  $H_2O_2$ -Generierung zu vermeiden, wurde dem Inkubationsmedium das antioxidative Enzym Katalase beigegeben. Dies ist notwendig um mögliche Verfälschungen der Biomarkerergebnisse zu vermeiden.

- In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde das antioxidative Potential unterschiedlicher Kaffeegetränke in zwei aufeinander folgenden Humanstudien in Kooperation mit dem Projektpartner charakterisiert.

Im Rahmen einer **ersten humanen Pilotstudie** (Intervention mit zwei Kaffeegetränken, die sich in ihrem N-Methylpyridinium (NMP)-Gehalt deutlich unterscheiden, TU München) wurde die Modulation (oxidativer) DNA-Schäden in Blutproben der Probanden untersucht, um präventive Einflüsse von NMP auf die DNA der Leukozyten zu erfassen.

Aufbauend auf den Ergebnisse dieser Pilotstudie wurde eine **zweite Humanstudie** (TU Kaiserslautern) durchgeführt, um die Wirksamkeit eines

Kaffees (*Coffea Arabica*) mit einem besonders hohen Gehalt an Antioxidantien, zu untersuchen. Die Herstellung des Studienkaffees wurde daraufhin optimiert, möglichst hohe Gehalte an Chlorogensäuren und an NMP zu erreichen. Zur Erfassung des antioxidativen Potentials wurden verschiedene Blutbiomarker ausgewählt, da Blut das erste System darstellt, in das die Antioxidantien nach ihrer Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt gelangen. Die Biomarker stehen in direktem Zusammenhang mit oxidativer Zellschädigung und bieten die Möglichkeit, die mögliche Prävention durch das Kaffeegetränk zu erfassen. Sie beinhalten die **(oxidativen) DNA-Schäden**, das **Gesamtglutathion (tGSH)**, **oxidiertes Glutathion (GSSG)** sowie den **Glutathionstatus** im Vollblut.

Um festzustellen, inwieweit der Studienkaffee auf die Entwicklung des Körpergewichts eine Rolle spielen könnte, wurde die Entwicklung von Körpergewicht und Körperzusammensetzung (Körperfett, Gesamtkörperwasser und Magermasse) mittels **Bioimpedanzanalyse (BIA)** bestimmt. Zusätzlich wurde die Nahrungsaufnahme der Probanden erfasst, um einen möglichen Einfluss des Kaffeekonsums auf die Nährstoff- und Energieaufnahme der Probanden und eine damit verbundene Körpergewichtsregulation zu erkennen. Dieses wurde durch das Führen von Ernährungsprotokollen erhoben und mit dem Nährwertkalkulationsprogramm **PRODI 5 Expert** ausgewertet.

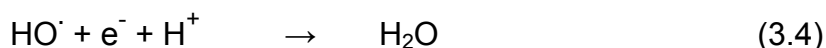
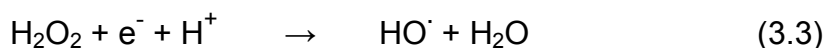
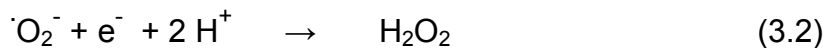
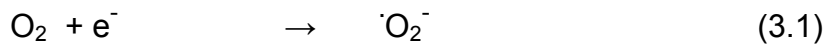
### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1 *Oxidativer Stress*

##### 3.1.1 **Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) spielen bei Entzündungen sowie bei der Kanzerogenese eine Rolle. Deshalb wird im Folgenden allgemein auf ihre Entstehung und Auswirkungen auf den Organismus und dessen Mechanismen der Abwehr eingegangen.

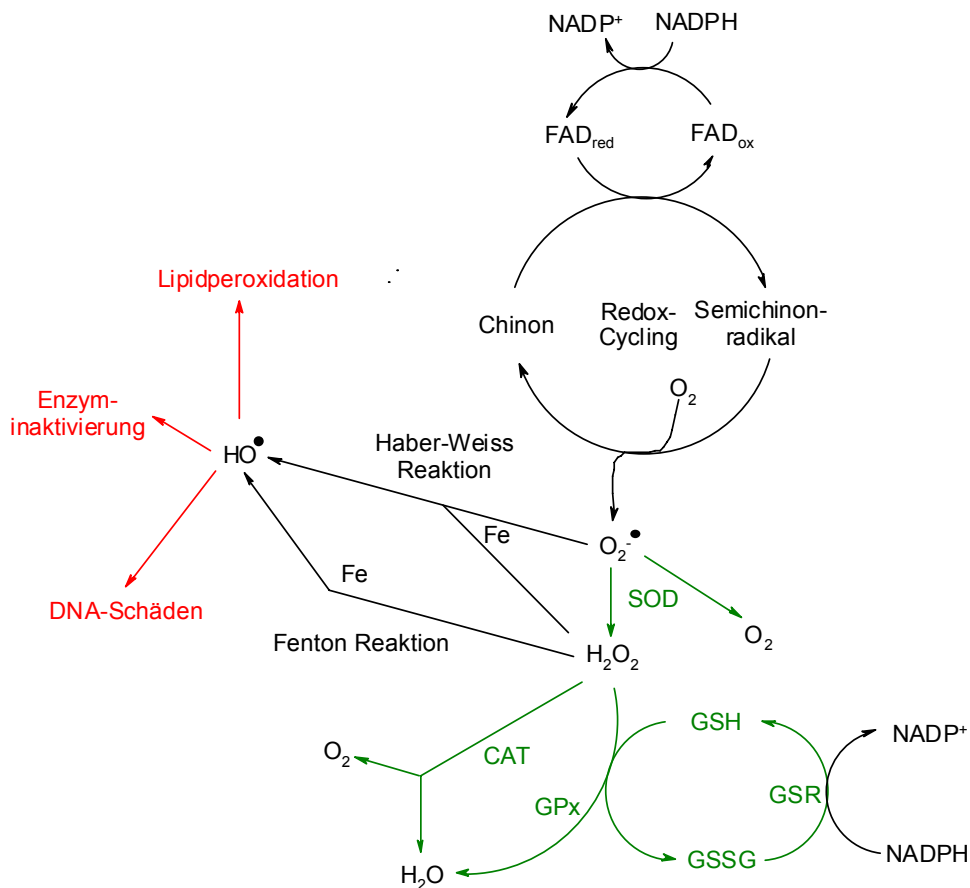
In aerob lebenden Organismen wird Sauerstoff für Oxidationsreaktionen benötigt. Das O<sub>2</sub>-Molekül ist in seinem Grundzustand mit zwei ungepaarten Elektronen (Triplettzustand) als freies Diradikal anzusehen und aus diesem Grund erfolgt hauptsächlich die Reaktion mit Radikalen. Bei der Zellatmung läuft die Reduktion von O<sub>2</sub> zu Wasser über vier Ein-Elektronen-Reduktionsschritte ab, die in Gln 3.1-3.4 dargestellt sind.



Durch die erste Ein-Elektronen-Reduktion entsteht ein Superradikaloxydianion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), durch eine zweite mit anschließender Protonierung Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Gln 3.1, 3.2). Aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann entweder das hochreaktive Hydroxylradikal (HO $\cdot$ ) (Gl. 3.3), oder durch Reduktion mit zwei Elektronen schließlich Wasser entstehen (Gln. 3.3, 3.4) [Berg *et al.*, 2003]. Zu geringen Teilen fällt vor allem  $\cdot\text{O}_2^-$  in der Zelle an. Zu den ROS zählen außerdem nicht-radikalische Formen, wie z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ozon (O<sub>3</sub>), hypochlorige Säure (HOCl), Alkylhydroperoxide und radikalische Derivate wie Alkoxy- und Alkylperoxyradikale (ROO $\cdot$ ) [Eisenbrand and Metzler, 2005]. Der Organismus steht diesen Ereignissen nicht wehrlos gegenüber, sondern hat Mechanismen entwickelt, ROS zu eliminieren, bevor sich die schädigende Wirkung manifestieren

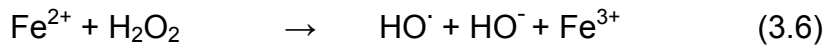
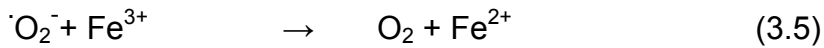
kann. Herrscht jedoch ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und Beseitigung von ROS, so wird dies als oxidativer Stress bezeichnet.

Abbildung 3-1 gibt einen Überblick über die Entstehung von ROS sowie die zellulären Abwehrmechanismen.



**Abbildung 3-1** Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen; modifiziert nach [Kelly et al., 1998; Sies, 1985]; CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxid-Dismutase, CYP: Cytochrom-P450- abhängige Monooxygenasen

Das **Hydroxylradikal** HO<sup>•</sup> wirkt als reaktivste Sauerstoffspezies [Sies, 1991] mit einem Standardreduktionspotenzial von 2,31 V stark oxidierend [Halliwell and Gutteridge, 1999]. HO<sup>•</sup> kann in vielen biologisch relevanten Systemen entstehen, wie z.B. durch die Schwermetallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion (z.B. mit Kupfer oder Eisen, Gl. 3.7) aus O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Eisenionen-katalysierte Teilreaktion wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet (Gl. 3.6) [Eisenbrand and Metzler, 2005].



Durch eine UV-Licht-induzierte homolytische Spaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder durch die Zersetzung von Wasser durch ionisierende Strahlung wird ebenfalls  $\text{HO}\cdot$  gebildet [Halliwell and Gutteridge, 1999].  $\text{HO}\cdot$  bevorzugen drei Reaktionstypen, die u.a. bei der Autoxidation von Fetten eine Rolle spielen: Wasserstoffabstraktion, Addition und Elektronentransfer.

Das **Superoxidradikalanion**  $\cdot\text{O}_2^-$  wird im Organismus durch einige Enzyme gebildet, die  $\text{O}_2$  zu  $\cdot\text{O}_2^-$  reduzieren (Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1: Beispiele für Enzyme, die  $\cdot\text{O}_2^-$  generieren, nach [Halliwell and Gutteridge, 1999].**

Enzym	Lokalisation
Peroxidasen (nicht spezifisch)	Pflanzen, Bakterien, Tiere
Xanthin-Oxidase	Darm, ischämisches Gewebe
NO-Synthase	(überwiegend) Säugetierzellen
Tryptophan-Dioxygenase	Leber
Aldehyd-Oxidase	Leber

Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin. Dabei werden Elektronen zu geringen Anteilen auf  $\text{O}_2$  anstatt auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Hämproteine, die nach  $\text{O}_2$ -Bindung und Elektronentransfer von  $\text{Fe}^{2+}$  auf den Sauerstoff  $\cdot\text{O}_2^-$  freisetzen, und Elektronentransportketten, wie in Cytochrom-P450-Enzymen oder in den Mitochondrien, gelten als wichtigste  $\cdot\text{O}_2^-$ -Quellen. Hier kommt es durch „Leckage“ zur direkten Elektronenübertragung auf den Sauerstoff. Etwa 1-3% des in den Mitochondrien verbrauchten  $\text{O}_2$  wird zu  $\cdot\text{O}_2^-$  reduziert, wodurch die erhöhte oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA erklärt wird [Halliwell and Gutteridge, 1999; Wei, 1998]. Des Weiteren wird  $\cdot\text{O}_2^-$  durch Autoxidationsreaktionen einiger Moleküle wie flavinhaltige Reduktionsäquivalente, Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin gebildet [Sies, 1991]. Xenobiotika können durch so genanntes „Redox-Cycling“ ebenfalls  $\cdot\text{O}_2^-$  generieren. Hierbei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein

Elektron auf, das dann auf  $O_2$  übertragen wird. Dieser Prozess ist für die Toxizität vieler Stoffe mitverantwortlich [Eisenbrand and Metzler, 2005].

**Singulett-Sauerstoff**  $^1O_2$  zeichnet sich dadurch aus, dass die beiden entarteten  $\pi^*$ -Molekülorbitale Elektronen mit entgegengesetztem Spin aufweisen. Dabei existieren zwei Formen, die sich in ihrer Elektronenkonfiguration und Reaktivität unterscheiden: Bei dem Zustand  $^1\Delta_g O_2$  handelt es sich zwar nicht um ein Radikal, da keine ungepaarten Elektronen vorliegen, er ist aber dennoch deutlich reaktiver als der Grundzustand.  $^1\Sigma_g^+ O_2$  ist wie der Grundzustand ein Diradikal (mit entgegengesetztem Elektronenspin) und noch reaktiver als  $^1\Delta_g O_2$ . Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  entsteht durch Lichtanregung und ist hinsichtlich Reaktionen mit Molekülen im Singulettzustand (z.B. Fettsäuren) wesentlich reaktiver als der Grundzustand  $^3O_2$ .  $^1O_2$  reagiert mit ungesättigten Fettsäuren in einer Art „Cyclo-Addition“ [Belitz *et al.*, 2001].

**Wasserstoffperoxid**  $H_2O_2$  wird durch enzymabhängige Prozesse gebildet. Guanylyl-Cyclase, Glukose-Oxidase, Monoamin-Oxidase oder Superoxid-Dismutase (SOD, s. Kap. 3.3.1) generieren  $H_2O_2$ , das nur noch schwach reaktiv ist [Halliwell and Gutteridge, 1999; Kelly *et al.*, 1998; Sies, 1991]: es kann weder DNA noch Lipide direkt oxidieren. Bei einigen Proteinen lassen sich jedoch durch  $H_2O_2$  Thiol-Gruppen oxidieren, die dadurch zudem inaktiviert werden können. Die wesentliche Toxizität von  $H_2O_2$  beruht auf der bereits beschriebenen Bildung von hochreaktivem  $HO^\cdot$ , die durch Metallionen-katalysierte Reaktion wie der Fenton-Reaktion entstehen.

Die Reaktivität der verschiedenen ROS spiegelt sich in ihrer Halbwertszeit wider (Tabelle 3-2): das hochreaktive  $HO^\cdot$  besitzt die kürzeste Halbwertszeit, wohingegen aus  $H_2O_2$  stabile Lösungen herstellbar sind. ROS stellen nicht ausschließlich schädigende Nebenprodukte von Enzymreaktion dar, sondern werden z.B. von Leukozyten aktiv gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen [Delves and Roitt, 2000]. Des Weiteren werden ROS bei der Synthese der Entzündungsmediatoren Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane aus Arachidonsäure benötigt [Halliwell and Gutteridge, 1999].

**Tabelle 3-2: Geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS, nach [Sies, 1991]**

	<b>Halbwertszeit</b>
Hydroxylradikal ( $\text{HO}^\cdot$ )	$10^{-9}$ s
Alkyl-Radikal ( $\text{R}^\cdot$ )	$10^{-8}$ s
Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ )	$10^{-6}$ s
Alkoxy-Radikal ( $\text{RO}^\cdot$ )	$10^{-6}$ s
Peroxy-Radikal ( $\text{ROO}^\cdot$ )	7 s
Semichinonradikal ( $\text{Q}^\cdot$ )	mehrere Tage
Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )	spontane und enzymatische Dismutation
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	stabil, enzymatischer Abbau

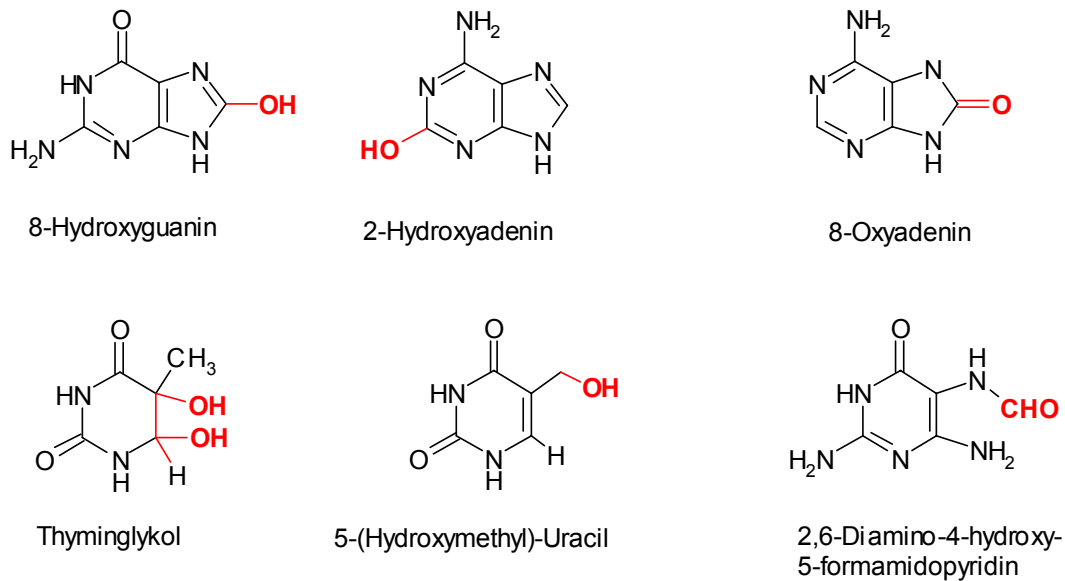
### 3.1.2 Folgen von oxidativem Stress

#### 3.1.2.1 DNA Schäden

In der Literatur ist der Zusammenhang zwischen ROS und der Krebsentstehung häufig beschrieben. Der Fokus liegt nicht nur auf einer direkten DNA-Schädigung, sondern ebenso auf einer Beeinflussung der Zellproliferation, Signaltransduktion, Zelltod und der interzellulären Kommunikation [Halliwell and Gutteridge, 1999; Klaunig *et al.*, 1998; Loft and Poulsen, 1996; Valko *et al.*, 2006].

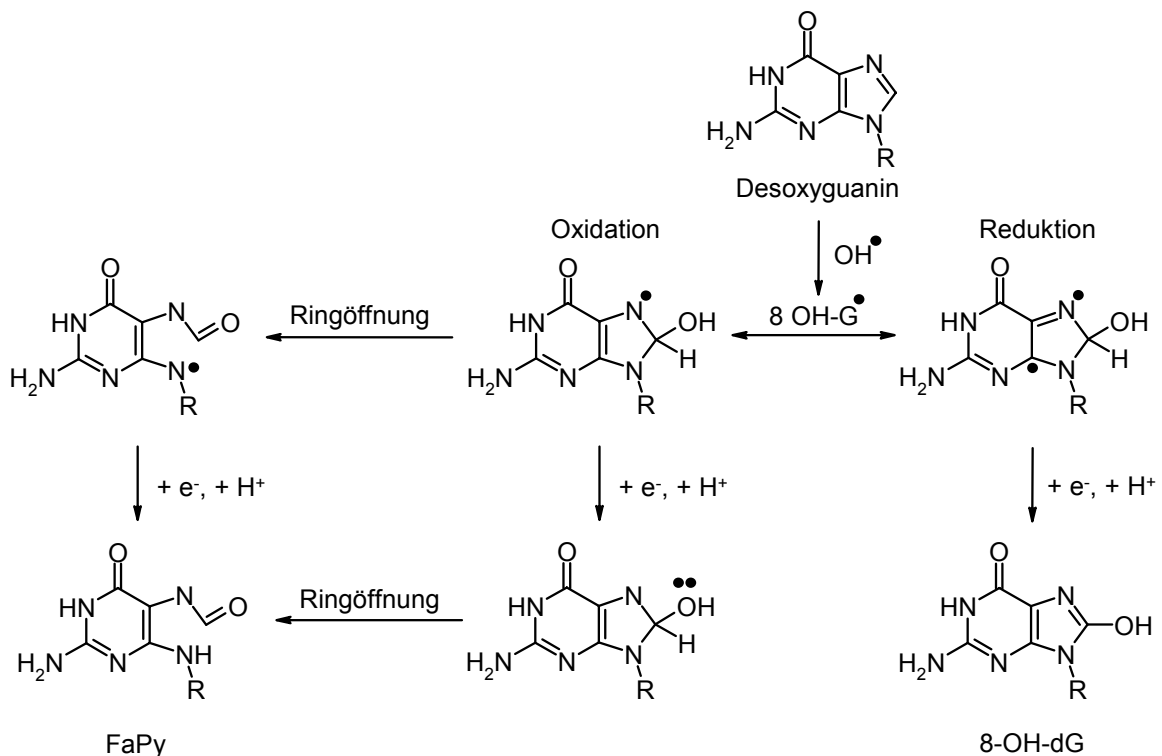
Von den ROS ist  $\text{HO}^\cdot$  für den größten Anteil an Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxylradikale und  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht direkt mit der DNA reagieren. Der Angriff von  $\text{HO}^\cdot$  an den Basen führt zu drei Arten von Schädigungen: Hydroxylierungen, Ringöffnungen und Fragmentierungen. Daraus entsteht eine Vielzahl von Sekundärprodukten. Außerdem wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat auch direkt geschädigt, was zu DNA-Strangbrüchen führt (Abbildung 3-2) [Kelly *et al.*, 1998].





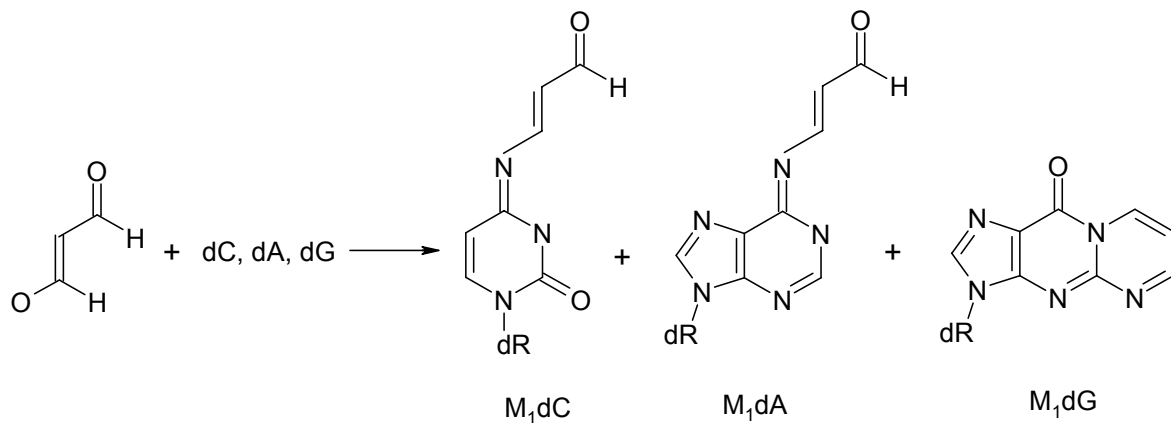
**Abbildung 3-2 Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine, nach [Meneghini, 1997]**

Ein Angriff des  $\text{HO}\cdot$  kann eine Vielzahl von Produkten zur Folge haben, z.B. Oxidation des Guanin in 4-, 5- oder 8-Position (8-Oxo-desoxyguanin oder 8-Hydroxy-desoxyguanin, 8-OH-dG) des Purinrings, die zu ringgeöffneten Produkten wie 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy) weiterreagieren (Abbildung 3-3). Ein Angriff an Pyrimidinen kann zudem zu Basendimeren führen [Halliwell and Gutteridge, 1999; Jaruga and Dizdaroglu, 1996; Kelly *et al.*, 1998].



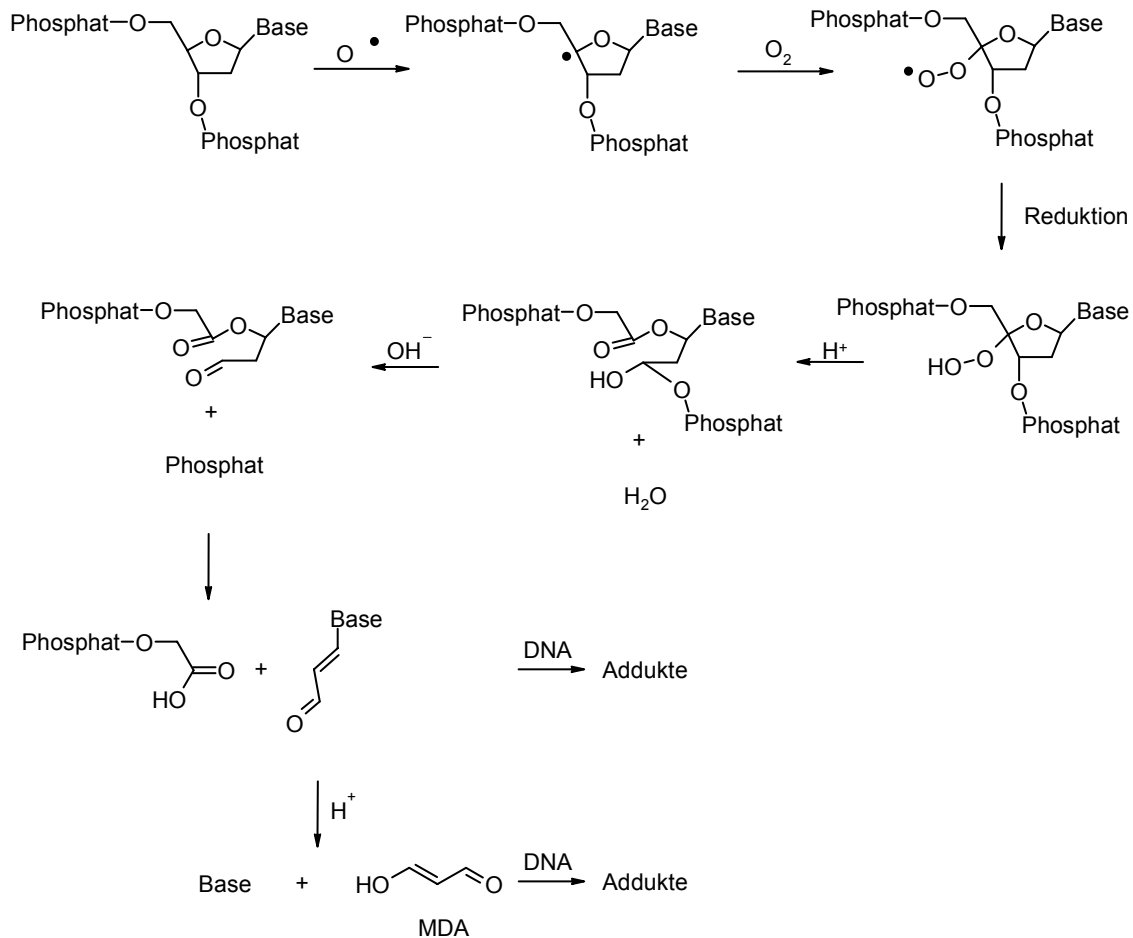
**Abbildung 3-3: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH-Radikale, nach [Halliwell and Gutteridge, 1999]**

Auch die während der Lipidperoxidation (LPO) entstehenden Produkte, können mit der DNA z.B. zu Etheno- oder Propano-Addukten reagieren, wie hier am Beispiel Malondialdehyd (MDA) gezeigt werden soll: MDA reagiert mit den DNA-Basen dC, dA und dG u.a. unter Adduktbildung zu M<sub>1</sub>dC, M<sub>1</sub>dA und dem Propano-Addukt M<sub>1</sub>dG (Abbildung 3-4) [Benamira *et al.*, 1995].



**Abbildung 3-4: Strukturen von MDA-DNA-Addukten, nach [Benamira *et al.*, 1995]**

Ein anderer (LPO-unabhängiger) Weg zu M<sub>1</sub>dG und anderen MDA-Addukten führt über einen Radikalangriff am DNA-Zuckerrückgrates in C-4'-Position (Abbildung 3-5.). Aus dem entstehenden „Basen-Propenal“ kann MDA effektiv auf dG übertragen werden. M<sub>1</sub>dG führt bei der Replikation zu Basenfehlpaarungen und ist deshalb als prämutagene Läsion anzusehen [Benamira *et al.*, 1995; Dedon *et al.*, 1998; Marnett, 1999].



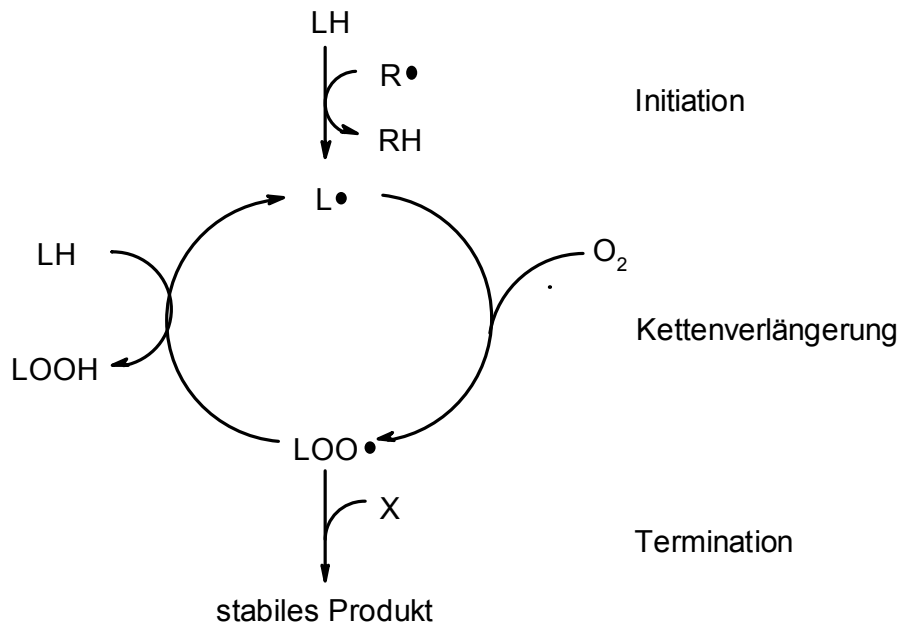
**Abbildung 3-5: Bildung von MDA und MDA-Addukten durch Reaktion von OH-Radikal mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, nach [Dedon et al., 1998; Janero, 1990]**

Nicht erkannte DNA-Schäden können bei der Zellteilung auf die DNA der Tochterzelle übertragen werden, die sich in Mutationen manifestieren und letztlich zu Störungen der Zellfunktionen und Krebs führen können [Hoeijmakers, 2001]. Klassifiziert werden Mutationen in solche des Genoms (numerische Änderung des Chromosomensatzes), der Chromosomen (strukturelle Veränderungen) und einzelnes Gene. Die Genmutation ist eine stoffliche Veränderung der DNA eines Gens, die auf die Tochterzellen bzw. den DNA-Tochterstrang übertragen wird. Ist nur ein einziges Basenpaar betroffen, so handelt es sich um eine Punktmutation. Weitere Mutationstypen sind Substitution, Deletion, Insertion, Genduplikation und Stop-Codon-Mutation.

### 3.1.2.2 Lipidperoxidation (LPO) und Proteinoxidation

Die zentrale Rolle der Lipide in zellulären Komponenten unterstreicht die Bedeutung ihrer möglichen Schädigung durch eine Oxidation in biologischen Systemen. Diese Oxidationsreaktionen, auch LPO-Kettenreaktion genannt, wird in drei Phasen

eingeteilt: Initiation, Kettenverlängerung und Termination; sie ist schematisch in Abbildung 3-6 dargestellt.



**Abbildung 3-6: Überblick über die LPO, nach [Kelly et al., 1998]; LH: Fettsäure; R·: reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem  $LOO\cdot$  abreagiert.**

Ideale Substrate für die LPO sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit bis-allylischen Methylen-Gruppen. An diesen Positionen besitzen die Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen niedrige Dissoziationsenergien, so dass Wasserstoffabstraktionen durch Radikalreaktionen leicht möglich sind [Kelly *et al.*, 1998]. Durch die Lipidperoxidation und die damit verbundene Fragmentierung entstehen verschiedenste gesättigte und ungesättigte Moleküle, z.B. Alkane, Aldehyde, Ketone und Furane [Belitz *et al.*, 2001]. Neben Eigenschaften als Aromakomponenten können diese reaktiven Moleküle auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Wirkungen aufweisen [Marnett, 1999].

Proteine können ebenfalls durch Reaktionen mit ROS oder LPO-Folgeprodukten geschädigt werden. Aminosäureseitenketten, v.a. von Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Prolin können oxidiert werden, was zu einer Spaltung der Peptidbindung führen kann. Die Oxidation des Proteinerückgrates durch H-Abstraktion vom  $\alpha$ -C-Atom hat die Spaltung der Peptidbindungen sowie intra- und intermolekulare Quervernetzungen zur Folge. Enzyme verlieren ihre Aktivität, wenn sie in der Nähe des katalytischen Zentrums verändert werden, Veränderungen von Rezeptoren und Transportproteinen beeinflussen den gesamten Zellstoffwechsel [Halliwell and Gutteridge, 1999]. Als Marker der Proteinoxidation wird häufig die Erfassung der Proteincarbonyle durch Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin herangezogen.

Die Detektion erfolgt photometrisch [Levine *et al.*, 1994], über ELISA oder semiquantitativ über Immunoblot [Nakamura and Goto, 1996].

### 3.2 Antioxidative Abwehrmechanismen

#### 3.2.1 Primäre endogene Abwehr

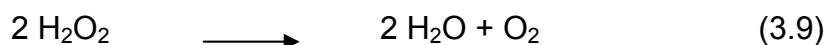
Da ROS reaktive Moleküle sind, besitzen aerobe Organismen effiziente Schutzmechanismen.

#### Enzymatischer Abbau von ROS durch sog. „antioxidative Enzyme“

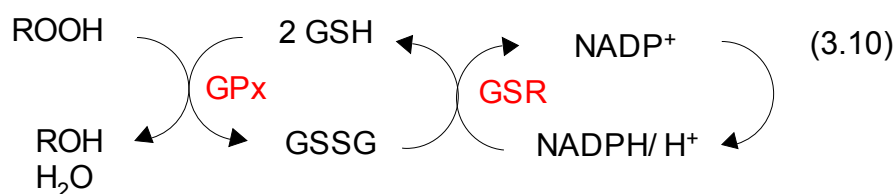
In Eukaryonten sind drei Isoformen der so genannten **Superoxid-Dismutase** (SOD, EC 1.15.1.1) bekannt: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD [Kelly *et al.*, 1998]. Alle drei Formen besitzen die Fähigkeit,  $\cdot\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  zu dismutieren (Gl 3.8).



Die **Katalase** (CAT, EC 1.11.1.6) kann das von der SOD gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  schnell und effektiv zu Wasser und  $\text{O}_2$  umsetzen (Gl. 3.9). Sie enthält entweder Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommt hauptsächlich in den Peroxisomen vor [Halliwell and Gutteridge, 1999].

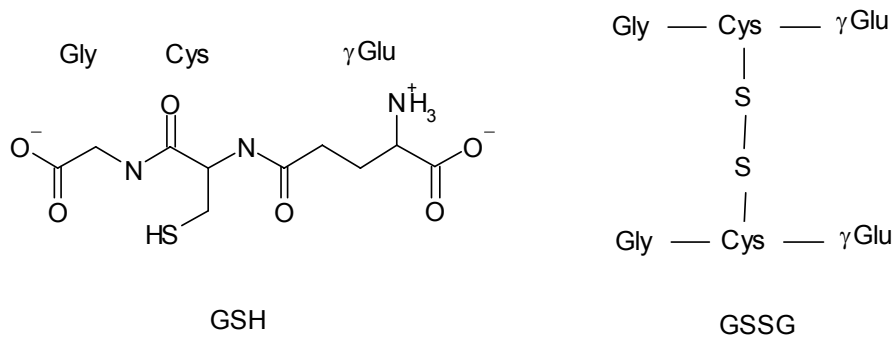


**Glutathion-Peroxidasen** (GPx, EC 1.11.1.9) reduzieren organische Peroxide ( $\text{ROOH}$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Reduktionsäquivalente werden von dem nicht-enzymatischen Antioxidans Glutathion (GSH) bereitgestellt. Die Regenerierung des daraus entstehenden GSSG wird durch die Glutathion-Reduktase (GSR) mit dem Cofaktor NADPH gewährleistet. (Gl. 3.10) [Kelly *et al.*, 1998].



Das ubiquitär verbreitete Tripeptid **Glutathion** (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinylglycine) wird in der Leber

durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und darauf folgender Kondensation mit Glycin synthetisiert und trägt als reaktive Gruppe eine Thiolgruppe (Abbildung 3-7). Katalysiert wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutathionsynthese durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcysteinylgase ( $\gamma$ -GCL, s. 3.2.3.2) [Meister and Anderson, 1983].



**Abbildung 3-7: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG), nach [Halliwell and Gutteridge, 1999]**

Die  $\gamma$ -GCL wird, wie auch andere Enzyme mit präventiver Wirksamkeit, über das „antioxidative response element“ (ARE) reguliert (s. Kap. 3.2.3). Glutathion kann in den Zellen in reduzierter (GSH) oder in oxidiert (GSSG) Form vorliegen, wobei der Anteil des GSH etwa 90% des Gesamtglutathions (tGSH) ausmacht und als GSH-Status bezeichnet wird (reduziertes Glutathion in % Gesamtglutathion). Die Thiolgruppe reduziert zahlreiche ROS ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\cdot$ ,  $^\cdot\text{O}_2^-$ ) und wird dabei zu GSSG oxidiert. Die Abnahme an reduziertem Glutathion kann in einer Senkung des GSH-Status resultieren, die die antioxidative Kapazität der Zelle verringert und so zu oxidativem Stress führt. Der oxidative Stress wiederum verursacht eine GSH-Depletion [Kelly *et al.*, 1998]. Es wurde gezeigt, dass eine GSH-Depletion durch Behandlung von Zellen u.a. mit Alkenalen mit einer höheren Sensitivität gegenüber Oxidantien (Endpunkt: oxidative DNA-Schäden) einher geht [Glaab *et al.*, 2001; Janzowski *et al.*, 2003].

Die Oxidation von GSH zu GSSG durch Glutathionreduktase (GSR, s.3.2.3.3) ist reversibel und stellt so ein Puffersystem für den Redoxzustand der Zelle dar. Eine bedeutende Rolle spielt GSH auch bei der Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe. Neben der Bildung wasserlöslicher Metabolite werden elektrophile Substanzen gebunden. Die meisten Elektrophile reagieren bereits nicht-enzymatisch mit GSH, die Reaktion wird jedoch häufig durch Glutathion-S-Transferasen beschleunigt [Eisenbrand and Metzler, 2005]. Neben der Aktivität der GSR spielt auch die Synthese von GSH eine große Rolle.

### **Proteine, die die Aktivität von Oxidantien minimieren**

Das Glykoprotein Transferrin bindet freie Eisenionen im Blutplasma (Konzentration: 1,2-3,7 g/L), die in dieser Form nicht mehr redoxaktiv sind und im Ferritin gespeichert werden, das mit seinem Umbauprodukt Hämosiderin etwa 20% des gesamten Eisenpools ausmacht [Eisenbrand and Schreier, 2005]. Kupferionen binden an das Plasmaprotein Albumin und an das spezifische Transport- und Speicherprotein Ceruloplasmin und werden so inaktiviert [Halliwell and Gutteridge, 1999].

### **Proteine, die Biomoleküle durch andere Mechanismen vor Schäden schützen**

Einige Hitzeschockproteine wie die Chaperone schirmen neu gebildete Proteine vor ihrer Umgebung ab, so dass sie sich richtig falten können [Stryer, 1996]. Auch die DNA im Zellkern wird durch Proteine (z.B. Histone) geschützt [Berg *et al.*, 2003].

### **Niedermolekulare Substanzen, die ROS abfangen können**

Die Eigenschaft dieser Substanzen beruht i.A. auf der Bildung resonanzstabilisierter Radikale, die nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Diese Stoffe werden unterteilt in exogene, über die Nahrung aufgenommene Stoffe (s. Kap. 3.4) und endogene, also vom Körper selbst produzierte Antioxidantien.

Zu letzterer Gruppe gehört **das Bilirubin, das ein (intensiv gelbes) Endprodukt des Hämabbaus darstellt**. Es liegt im Plasma hauptsächlich Albumin-gebunden in Konzentrationen von 3-21  $\mu\text{mol/L}$  vor. *In vitro* wurde gezeigt, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und  $^1\text{O}_2$  abfangen kann. Die Bedeutung *in vivo* ist allerdings noch unklar [Berg *et al.*, 2003; Halliwell and Gutteridge, 1999].

Aus Hypoxanthin werden durch die Xanthin-Oxidase **Harnsäure** und Xanthin (Purinabbau) gebildet. In vielen Spezies, nicht aber im Mensch und anderen Primaten, wird Harnsäure über Allantoin zu Harnstoff und Glyoxylat abgebaut. Im Menschen liegt Harnsäure normalerweise in Plasmakonzentrationen von 120-360  $\mu\text{M}$  vor. Sie bildet nach Abfangen von Radikalen oder Oxidation durch ROS ein Resonanz-stabilisiertes Harnstoffradikalanion, das nicht mehr zu einer Wasserstoffabstraktion fähig ist. Durch Zwei-Elektronen-Übertragung kann Harnsäure weiter oxidiert werden. [Becker, 1993; Berg *et al.*, 2003].

### 3.2.2 Sekundäre endogene Abwehr

Neben der direkten Unschädlichmachung von reaktiven Sauerstoffspezies durch antioxidative Enzyme und Moleküle, hat der Organismus auch Strategien zur Reparatur gesetzter Schäden an Makromolekülen (DNA, Proteine, Lipide) entwickelt [Chiou and Tzeng, 2000; Pacifici and Davies, 1991].

#### DNA-Reparatur

DNA-Reparatursysteme erkennen modifizierte und fehlgepaarte DNA-Basen. Solche Modifikationen sind vor allem oxidierte Basen [Christmann *et al.*, 2003]. Durch Erkennen und Herausschneiden der geschädigten Base durch die DNA-Glykosylase entstehen sog. apurine/apyrimidine, (AP-) Stellen, durch die das wichtigste Reparatursystem bei DNA-Schädigung, die sog. „Base Excision Repair“, BER in Gang gesetzt wird (Abbildung 3-8).

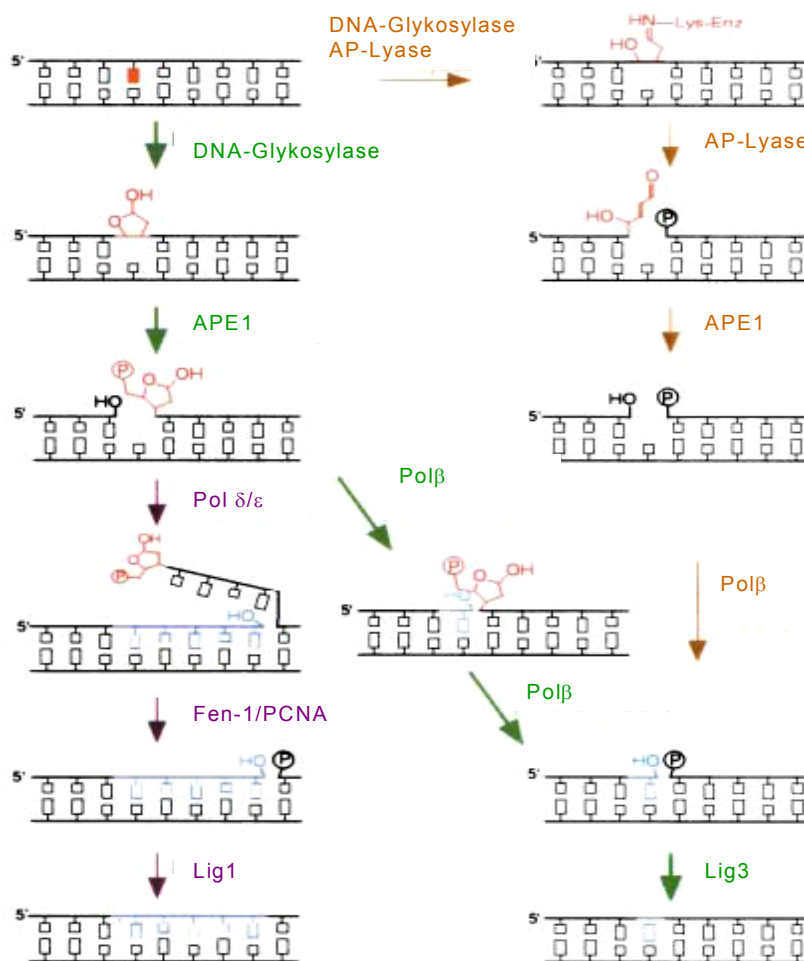


Abbildung 3-8: schematische Darstellung der BER, nach [Christmann *et al.*, 2003]

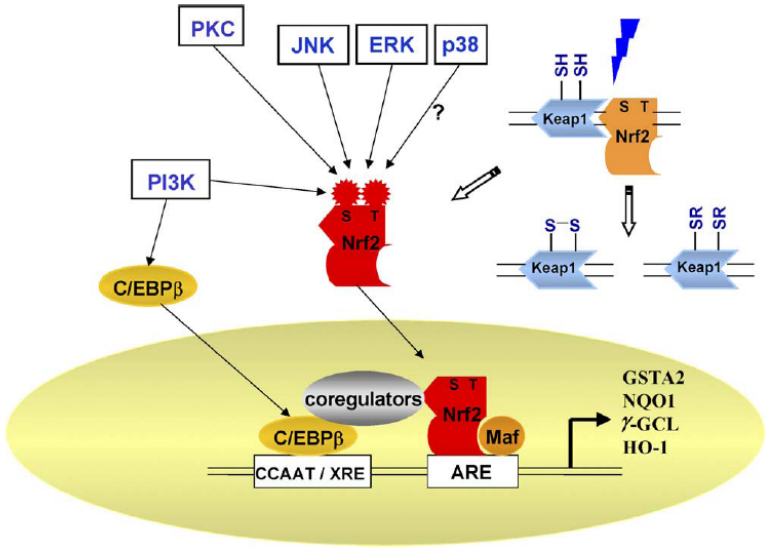


Bei der BER wird an der AP-Stelle durch die AP-Endonuklease ein Strangbruch eingeführt. Anschließend wird durch eine Polymerase der Zucker herausgeschnitten und das neue, intakte Nukleotid eingeführt. Eine Ligase schließt die Lücke wieder. Die Nukleotidausschneidereparatur („Nucleotid Excision Repair“, NER) funktioniert ähnlich, ist aber aufwändiger, da das herausgeschnittene Stück etwa 30 DNA-Basen lang ist [Hoeijmakers, 2001].

Das Reparatursystem wird unterstützt durch einen p53-vermittelten (vorübergehenden) Zellzyklusarrest. Dadurch wird die Zellteilung und somit die Weitergabe der DNA-Schäden an Tochterzellen verzögert, bis der Schaden repariert wurde. Ist das Ausmaß der Schäden zu schwer, tritt ein programmierte Zelltod (Apoptose) ein [Hoeijmakers, 2001].

### **3.2.3 Antioxidative Response Element (ARE)**

Neben der Beseitigung von ROS und der Reparatur bereits geschädigter Makromoleküle spielt die Regulation detoxifizierender Enzyme z.B. über das antioxidative response element (ARE) eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr. Das ARE ist eine cis-aktive Enhancer-Sequenz, die die Aktivierung von Genen in Zellen vermittelt, die oxidativem Stress ausgesetzt sind. Eine Vielzahl von Genen, die detoxifizierende und antioxidativ wirkende Enzyme codieren, werden in ihrer Expression durch den nukleären „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf2) reguliert. Nrf2 gehört zur Familie der basischen Leucinezipper-Transkriptionsfaktoren und ist im inaktivierten Zustand im Cytosol der Zelle an das im Zytoskelett verankerte cysteinreiche Protein „Kelch-like-ECH-associated Protein 1“ (Keap1) in einem inaktiven Komplex gebunden [Lee and Surh, 2005]. In diesem Zustand wird das Nrf2 dem ubiquitinabhängigen Abbau zugeführt. Erst durch die Modifikation essentieller SH-Gruppen am Keap1 durch redoxvermittelte Prozesse oder durch Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Keap1, die ein Herauslösen des Nrf2 aus dem Nrf2/Keap1-Komplex zur Folge hat. Das Nrf2 transloziert daraufhin in den Zellkern und heterodimerisiert mit anderen basischen Leucinezipperproteinen wie den Maf-Proteinen. Dieses Heterodimer bindet an die ARE-Sequenz in der Promotor-Region des Zielgens und induziert die Transkription des entsprechenden Gens (Abbildung 3-9). Die AREs sind sowohl für die basale als auch für die induzierte Expression von Genen verantwortlich [Nguyen *et al.*, 2003].

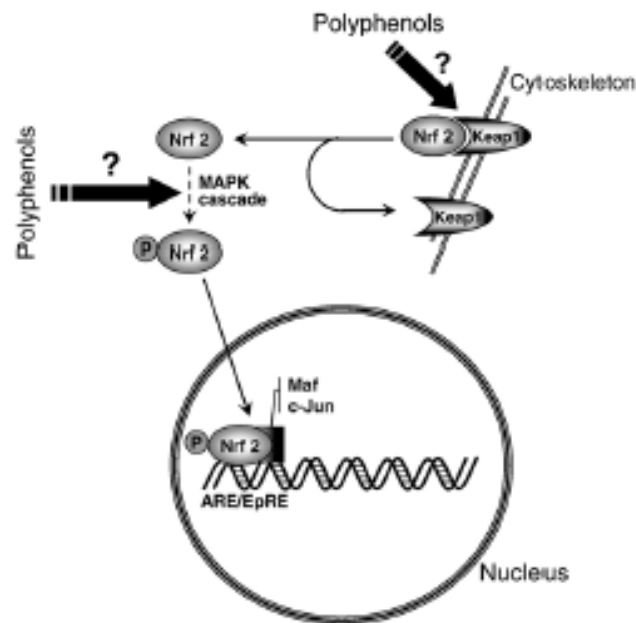


**Abbildung 3-9: Mechanismus der ARE-vermittelten Genexpression modifiziert nach [Kensler et al., 2003]**

Zu den durch das ARE regulierten Enzymen gehören unter anderem detoxifizierende Enzyme des Fremdstoffmetabolismus (NAD(P)H Chinon-Oxidoreduktase-1(NQO1)), Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyl-Transferasen, antioxidative Enzyme (Hämoxygenase-1 (HO-1), Glutathionreduktase (GSR)), Enzyme der Glutathion-synthese ( $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase,  $\gamma$ -GCL als Schlüsselenzym) und Redoxproteine mit aktiven Sulfhydryl-Gruppen (z.B. Thioredoxin) [Lee *et al.*, 2005].

AREs können durch eine Reihe strukturell unterschiedlicher Substanzen aktiviert werden. Dazu gehören planare Flavonoide und phenolische Antioxidantien, Chinone, Mercaptane, thiolhaltige Strukturen wie Isothiocyanate, Schwermetalle, Hämkomplexe u.a. Die meisten dieser Aktivatoren weisen elektrophile und sulfhydrylbindende Eigenschaften auf [Lee and Surh, 2005; Nguyen *et al.*, 2003]. Substanzen, die lediglich nur das ARE aktivieren, werden als „monofunktionelle Induktoren“ bezeichnet, z.B. Quercetin und Propylgallat. „Bifunktionelle“ Induktoren induzieren Phase-I-Enzyme über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und nach ihrer Metabolisierung Phase-II-Enzyme über AREs, z.B. Benzylisothiocyanat, Cumarin, Ethoxyquin und Oltipraz [Dinkova-Kostova and Talalay, 2008; Nguyen *et al.*, 2003]. Dual wirkende Induktoren hemmen Phase-I-Enzyme, induzieren jedoch Phase-II-Enzyme. Zu diesen gehören z.B. 4-Methoxyphenol und *tert*-Butylhydroxyanisol [Henderson *et al.*, 2000; Lee and Surh, 2005]. Zahlreiche Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass über die Nahrung aufgenommene Polyphenole (s. 3.4.1) die Transkription antioxidativer und detoxifizierender Abwehrsysteme über AREs aktivieren können. Diskutierte Interaktionen (s. Abbildung 3-10) sind die

Veränderung der Bindung von Keap1 mit darauffolgender Freisetzung von Nrf2 und die Aktivierung von MAPK Proteine, die in die Stabilisierung von Nrf2 involviert sind [Masella *et al.*, 2005].



**Abbildung 3-10: Vorgeschlagene Induktion von Phase II Genexpression durch Polyphenole über ein ARE [Masella *et al.*, 2005].**

### 3.2.3.1 NAD(P)H:Chinon-oxidoreduktase (NQO1)

Das ARE-abhängige Enzym NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase 1 (EC 1.6.5.2) ist ein ubiquitär vorkommendes cytosolisches Flavoprotein. Das Enzym ist ein Homodimer, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten (Molekulargröße von 30 kDa) und einem Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als prostetischer Gruppe [Bianchet *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2000]. Eine starke Expression findet in Leber, Magen, Niere aber auch in anderen Geweben wie Kolon, Lunge und Brust statt [Ernster, 1967; Jaiswal, 1991]. NQO1 katalysiert die Detoxifikation von Chinonen zu Hydrochinonen in einer 2-Elektronen-Reduktionsreaktion (Abbildung 3-11) unter Verwendung der Reduktionsäquivalente NADH oder NAD(P)H. Dabei werden stabile Verbindungen gebildet, die in weiteren Metabolisierungsschritten sulfoniert oder glucuronidiert und anschließend aus der Zelle ausgeschieden werden können [Ross *et al.*, 2000]. Dieser Prozess umgeht die Bildung potenziell toxischer Semichinonradikalintermediate und schützt somit die Zellen gegen Chinon-induzierten oxidativen Stress, Zytotoxizität und Mutagenität [Dietz *et al.*, 2005]. Somit kann NQO1 als Teil des antioxidativen Schutzsystems des Menschen betrachtet werden.

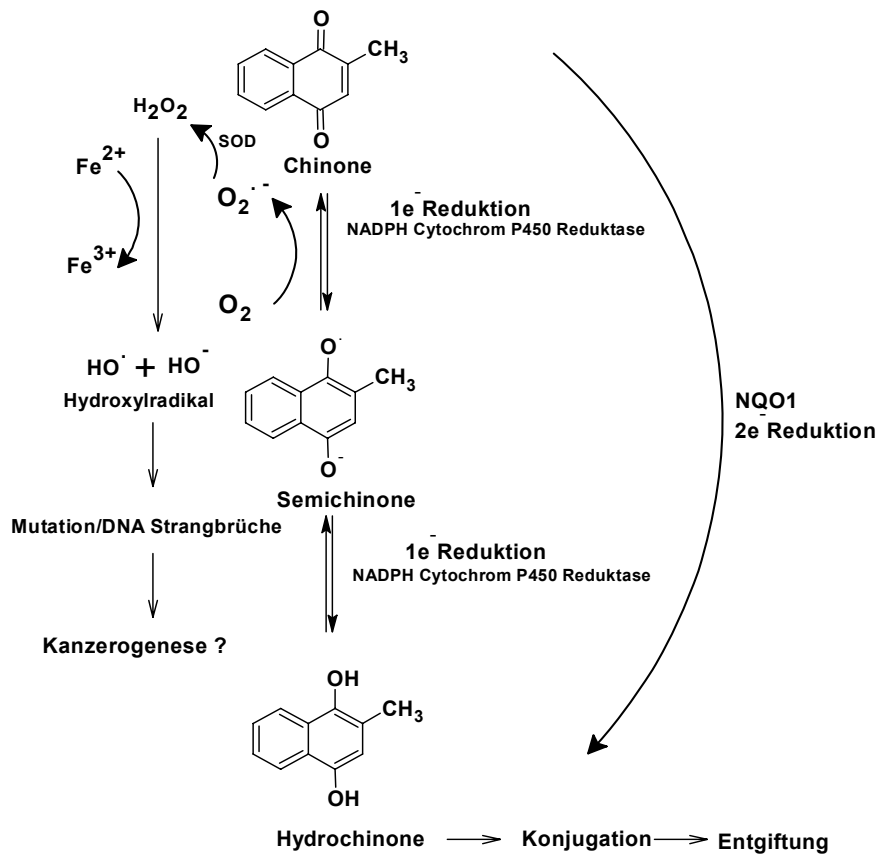


Abbildung 3-11: Ein und zwei Elektronen-Reduktionsreaktion modifiziert nach [Ross *et al.*, 2000]

Die NQO1 Aktivität ist durch bifunktionale Induktoren, die neben Phase II - Enzymen auch die Expression von Phase I-Enzyme erhöhen, und durch monofunktionale Induktoren, die ausschließlich Phase II- Enzymen erhöhen, induzierbar [Prochaska and Talalay, 1988]. Zu der letztgenannten Gruppe gehören ernährungsrelevante Substanzen wie z.B. Polyphenole [Benson *et al.*, 1980], Flavanole [Valerio *et al.*, 2001], Isoflavanole [Wang *et al.*, 1999a] und Isothiocyanate [Bonnesen *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2001].

### 3.2.3.2 $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL)

Das ARE-abhängige Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL EC 6.3.2.2) katalysiert den (ersten) geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glutathionsynthese und verknüpft L-Glutamat mit L-Cystein. Die Reaktion ist mit der Spaltung eines Moleküls ATP zu ADP und Phosphat gekoppelt (Gl. 11). GSH wird anschließend in einer durch

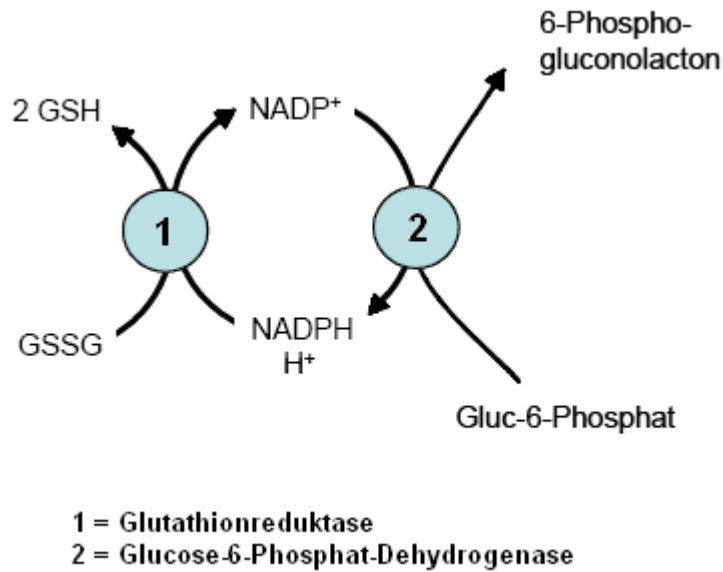
die Glutathionsynthase (GS) katalysierten Kondensation von Glycin an  $\gamma$ -Glutamylcystein gebildet (Gl. 12) [Toroser *et al.*, 2006].



$\gamma$ -GCL setzt sich aus einer schweren, katalytischen Untereinheit (GCLc, 73 kDa) und einer leichten regulatorischen Untereinheit (GCLm, 31 kDa) zusammen [Toroser *et al.*, 2006]. In seiner katalytisch aktiven Form liegt es bei Eukaryonte als Heterodimer vor. Die Expression von  $\gamma$ -GCL findet beim Menschen in allen Geweben statt. In der menschlichen Leber werden besonders große Mengen an GSH produziert, was den Schluss zulässt, dass dort auch die  $\gamma$ -GCL am stärksten exprimiert wird. Andere wichtige Gewebe, in denen das Enzym gebildet wird, sind die Epithelzellen der Bronchien, Erythrozyten, Killerzellen des Immunsystems, sowie in Darm, Herz und Nieren. Die  $\gamma$ -GCL Expression wird hauptsächlich durch den Nrf2-ARE Signalweg ermittelt (s. 3.2.3).

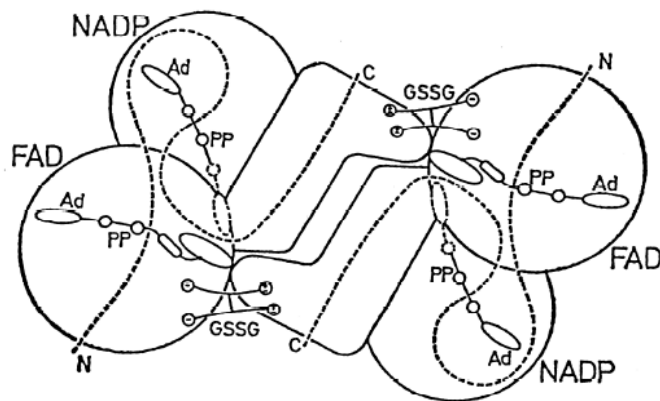
### 3.2.3.3 Glutathionreduktase (GSR)

Bei der Reduktion von Radikalen und Peroxiden wird reduziertes Glutathion zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. Um den normalerweise intrazellulär vorliegenden hohen GSH/GSSG-Quotienten aufrechtzuerhalten, muss das GSH durch Reduktion des GSSG regeneriert werden. Diese Reaktion wird von der NADPH-abhängigen Glutathionreduktase (EC 1.8.1.7) katalysiert (Abbildung 3-12). Die Hauptquelle für NADPH ist die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion des Pentosephosphatweges [Marquardt and Schäfer, 2004; Staal *et al.*, 1969; Worthington and Rosemeyer, 1976]. GSR ist ein homodimeres Flavoprotein, das aus zwei Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von 52,4 kDa besteht. Isoformen der GSR sind für Säugetiere bisher noch nicht beschrieben worden. Das Holoenzym besteht aus Apoglutathionreduktase und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe [Kamerbeek *et al.*, 2007; Worthington and Rosemeyer, 1976].



**Abbildung 3-12: Regeneration des Glutathions durch die Glutathionreduktase**

Beide Untereinheiten sind durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden und binden je ein Molekül FAD im aktiven Zentrum (Abbildung 3-13). Die von der GSR katalysierte Reaktion verläuft mehrstufig. Zuerst werden Elektronen auf das enzymgebundene FAD übertragen, dann auf zwei Cysteinreste des Enzyms selbst, bevor die Übertragung auf das Glutathion erfolgt [Schulz *et al.*, 1978].

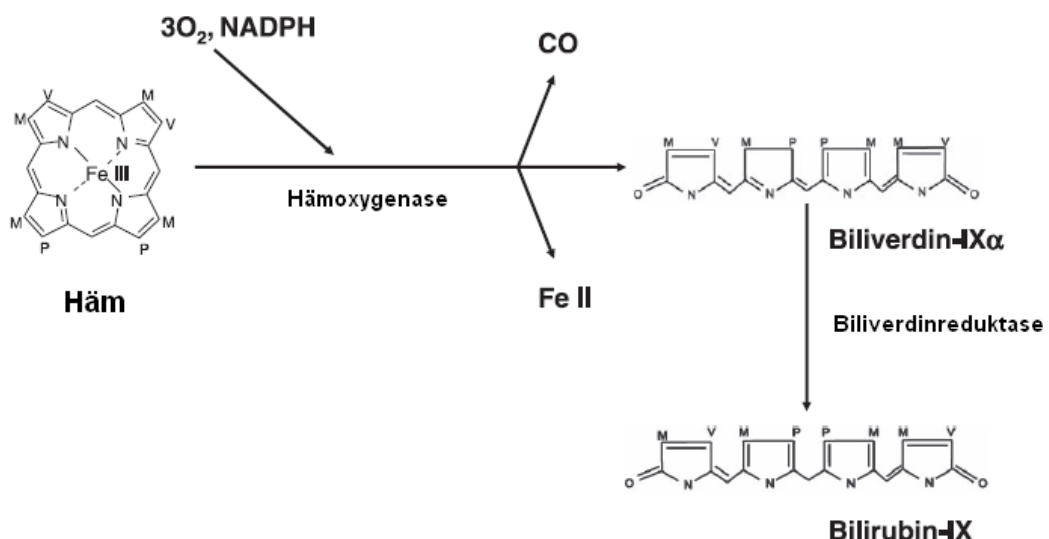


**Abbildung 3-13: Struktur der GSR modifiziert nach [Schulz *et al.*, 1978]**

GSR kommt ubiquitär in allen Zellen vor. Sie ist im Cytosol und in den verschiedenen Kompartimenten der Mitochondrien lokalisiert. Eine hohe Expression findet man in der Leber, der Niere, den Erythrozyten, den Leukozyten und der Lunge.

### 3.2.3.4 Hämoxxygenase

Die Hämoxxygenase (HO, EC 1.14.99.3) ist ein mikrosomales Enzym, das den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämabbaus zu den Gallenpigmenten katalysiert. Es existieren zwei Isoformen der HO: das induzierbare Isoenzym HO-1 (32 kDa) und eine erst kürzlich entdeckte konstitutive Form des Enzyms, die HO-2 (36 kDa) [Tenhunen *et al.*, 1968]. Beide Isoformen katalysieren die gleiche Reaktion des Hämabbaus (Abbildung 3-14), die zur Bildung des offenkettigen Tetrapyrrols Biliverdin-IX $\alpha$  führt. Die Hämoxxygenase zeigt Regiospezifität, sodass nur das  $\alpha$ -Isomer des Biliverdins gebildet wird. In Säugern wird das Biliverdin anschließend durch die NAD(P)H-abhängige Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin IX $\alpha$  konvertiert. Bei der von der Hämoxxygenase katalysierten Reaktion werden das Häm-Eisen als Fe (II) und das Kohlenstoffatom der  $\alpha$ -Methenbrücke des Häms als Kohlenmonoxid (CO) freigesetzt [Ryter *et al.*, 2006]. Die Erkenntnis, dass die entstehenden Produkte CO und Biliverdin bzw. dessen Folgeprodukt Bilirubin physiologische Wirksamkeit besitzen, hat zu einem großen Interesse an der Hämoxxygenase geführt: CO gilt als ein möglicher Mediator bei physiologischen Prozessen wie Entzündungen, Zellproliferationen und Apoptose. Dem durch den Hämabbau gebildeten Bilirubin wird eine Bedeutung als physiologisch wirksame antioxidative Substanz zugeschrieben [Ryter *et al.*, 2006].



**Abbildung 3-14: Reaktionsschema des Hämabbaus durch die Hämoxxygenase und die Biliverdinreduktase modifiziert nach [Ryter *et al.*, 2006]**

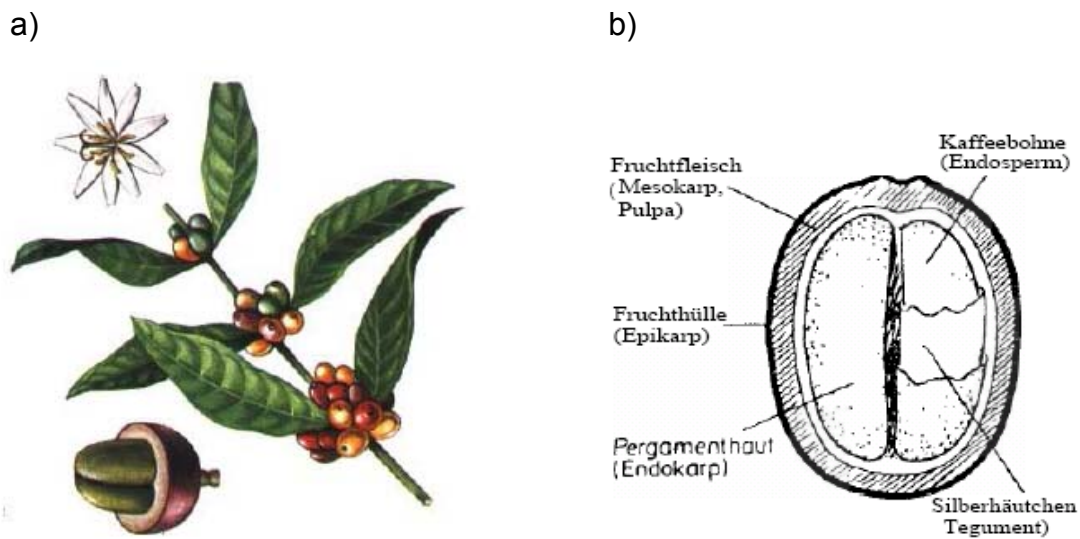
80 bis 85 % des gebildeten Bilirubins stammen aus dem Hämoglobin alternder oder beschädigter Erythrozyten [Ostrow *et al.*, 1962]. Eine hohe Expression und Aktivität der induzierbaren HO-1 ist daher in Geweben zu finden, die am Abbau gealterter Blutzellen beteiligt sind. Dazu gehören die Milz und die Retikuloendothel-Zellen der Leber und des Knochenmarks. In den anderen Geweben, die nicht direkt am Erythrozyten- und Hämabbau beteiligt sind ist die basale Konzentration der HO-1 niedrig bis nicht detektierbar.

### **3.3 Kaffee**

Unter Kaffee versteht man die von der Fruchtschale vollständig und von der Samenschale nach Möglichkeit befreien, rohen oder gerösteten Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea*, wie auch das daraus zubereitete Getränk. Seit seiner Entdeckung im 6. Jahrhundert in der Provinz Kaffa, dem heutigen Äthiopien, breitete er sich allmählich über die islamische Welt aus und wurde schließlich von den europäischen Kolonialmächten weiter verbreitet. Der Kaffeebaum gehört zur Familie *Rubiaceae* und wächst besonders gut in tropischen Höhenlagen. Er erreicht eine Höhe von 3-12 m, wird aber für eine einfachere Ernte auf eine Höhe von 2 m gestutzt. An den lang auslaufenden rutenförmigen Zweigen sitzen die kurzstieligen, immergrünen, lederartigen Blätter und weiße Blüten, aus denen sich kirschähnliche Steinfrüchte entwickeln. Die Frucht selbst ähnelt äußerlich der europäischen Kirsche, ist anfangs grün und färbt sich im reifen Zustand rot bis violett (Abbildung 3-15) [Belitz, 2005; Selmar and Bytof, 2008].

Die Gattung *Coffea* umfasst etwa einhundert verschiedene Arten. Nur drei davon werden zur Herstellung von Kaffeegetränken verwendet: der Arabica-Kaffee (*Coffea arabica*), der Robusta-Kaffee (*Coffea canephora*) und der Liberica-Kaffee (*Coffea liberica*); letzterer besitzt jedoch keine wirtschaftliche Bedeutung. Etwa 70 % der Welterzeugung gehen auf Arabica-Kaffee zurück [Selmar and Bytof, 2008; Selmar D. and G., 2008].





**Abbildung 3-15: a) Kaffeepflanze;**

**b) Schnitt durch Kaffee Frucht, [Belitz, 2005]**

In Kaffeepplantagen werden die auf Strauchhöhe zurechtgeschnittenen Kaffeepflanzen ein bis zweimal im Jahr per Hand geerntet. Anschließend werden die reifen Kaffeekirschen entweder über die trockene oder die nasse Aufbereitung von ihrem Fruchtfleisch befreit und getrocknet. Jedoch entsteht erst durch den Röstprozess das typische Kaffee-Aroma und Aussehen, das den Röstkaffee kennzeichnet. Im Rahmen des Röstprozesses unterscheidet man vier Hauptphasen: Trocknung, Entwicklung, Zersetzung und Vollröstung. Bei 50°C gerinnt das Eiweiß und das Wasser verdampft. Oberhalb von 100°C tritt eine Bräunung der Bohne durch beginnende Maillard-Reaktionen und eine thermische Zersetzung von organischen Substanzen ein. Bei etwa 150°C entstehen gasförmige Produkte (Wasserdampf, CO<sub>2</sub>, CO), die zur Volumenvermehrung führen. Bei 180-200°C beginnt die Zersetzungsphase, die durch Aufplatzen der Bohnen, Bildung eines bläulichen Rauches und das Auftreten des typischen Kaffeearomas gekennzeichnet ist. Karamellbildung und ein gesunkener Wassergehalt auf 1,5-3,5% schließen diesen Röstvorgang ab. Die notwendige Wärmeübertragung bei der Röstung erfolgt durch Kontakt der Bohnen mit den Wänden der Röstapparatur bzw. durch Heißluft (Konvektion). Der angestrebte Röstgrad ist sehr unterschiedlich. In den USA und in Mitteleuropa wird hell geröstet (200-220°C, 3-10 Minuten), in Frankreich, Italien und den Balkanländern zum Teil auch stark dunkel (Espressokaffee, 230°C). Mit Temperaturen zwischen 200 und 260° C beim Rösten kommt es, abgesehen vom

optisch erkennbaren Bräunungsprozess, zu tief greifenden Vorgängen innerhalb der Kaffeebohne. Der Gehalt von Substanzen nimmt ab oder zu, und neue Stoffe entstehen. Und das unvergleichliche Aroma und der einzigartige Geschmack des Kaffees ist erst das Ergebnis dieses Röstprozesses [Belitz, 2005; Eggers, 2001].

Im Kaffee finden sich über tausend chemische Stoffe (rund 850 flüchtige und 700 lösliche Substanzen), wobei seine chemische Zusammensetzung und Gehalt von Sorte zu Sorte verschieden sind und je nach Röstgrad variieren (Tabelle 3-3). Faser- und Gerüststoffe (Cellulose, Lignin und Hemicellulose) sowie Lipide, Mineralien, Monosaccharide aber auch Koffein werden in ihren Gehalten nur sehr geringfügig durch den Röstprozess verändert. Demgegenüber stehen Verbindungen, die durch entsprechend hohe Temperaturen zu großen Teilen im Zuge von Maillard-Reaktionen oder durch thermische Zersetzung abgebaut werden (z.B. Chlorogensäuren und Trigonellin, s. 3.4.1 und 3.4.5)

**Tabelle 3-3: Zusammensetzung von Röstkaffee (mittlerer Röstgrad) [Belitz, 2005]**

Substanz	Arabica (%)	Robusta (%)
Coffein	1,3	2,4
Lipide	17,0	11,0
Protein	10,0	10,0
Kohlenhydrate	38,0	41,5
<b>Trigonellin, Niacin</b>	1,0	0,7
Aliphat. Säuren	2,4	2,5
<b>Chlorogensäuren</b>	2,7	3,1
Flüchtige Verb.	0,1	0,1
Mineralstoffe	4,5	4,7
Melanoidine	23,0	23,0

### **3.4 Kaffeeinhaltsstoffe und ihre biologische Wirkungen**

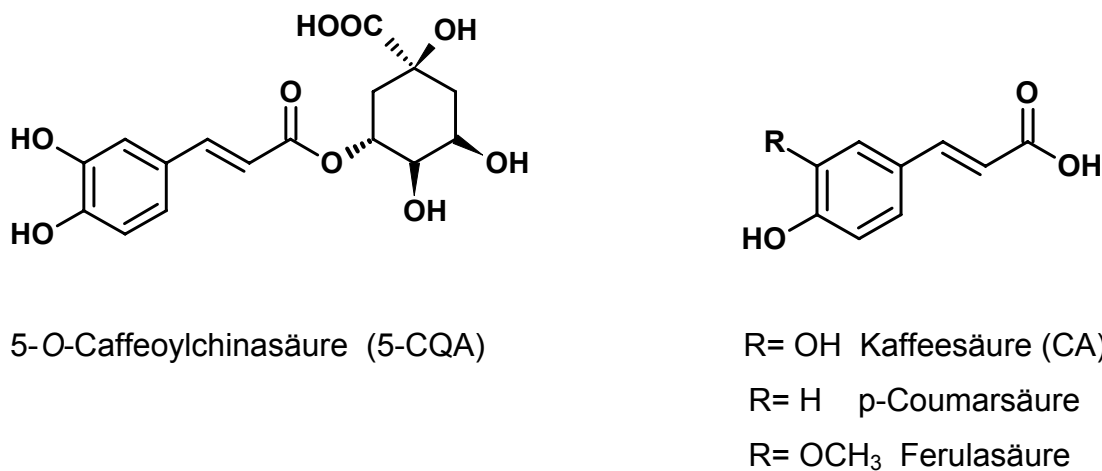
Die komplexe Zusammensetzung von Kaffee und die enormen Belastungen der Kaffeebohnen während ihrer Röstung tragen dazu bei, dass im fertigen Kaffeegetränk mehr als 1000 verschiedene Inhaltsstoffe zu finden sind, von denen man bis heute noch nicht alle chemisch entschlüsselt hat. Die Mengenverhältnisse

variieren je nach Kaffeesorte, Wachstumsbedingungen der Pflanze und den Röstverfahren. Neben Wasser, Eiweiß, Lipiden und Kohlenhydraten, die in allen Pflanzen vorkommen, enthält Kaffee Alkaloide (vor allem Koffein, Trigonellin), Phenolcarbonsäuren (z.B. Chlorogensäuren), Vitamine und Mineralstoffe, denen er seinen Geschmack, sein Aroma und seine physiologische Wirkung verdankt [Arya and Rao, 2007].

Die Beliebtheit des Kaffees beruht vor allem auf seiner anregenden Wirkung und damit erhöhten geistigen Leistungsfähigkeit. Dafür ist im Wesentlichen Koffein verantwortlich wobei unterschiedliche Mechanismen, wie der Methylxanthin-Adenosin-Antagonismus, die Hemmung der Phosphodiesterase und die Mobilisierung des Calciums aus dem sarkoplasmatischen Reticulum diskutiert werden [Czok, 1976]. Neben dieser anregenden Wirkung vermögen Kaffee noch eine Reihe weiterer pharmakologischer Einflüsse auf den Organismus. Der Konsum von Kaffee wird sehr unterschiedlich diskutiert, da verschiedene negative Einflüsse wie die Erhöhung des Blutzuckers, eine entwässernde Wirkung sowie eine Schädigung des Herz-Kreislauf-Systems bei Risikogruppen bzw. bei Menschen mit überdurchschnittlich hohem Kaffeeconsum gezeigt werden konnten [Greenberg *et al.*, 2006; Mursu *et al.*, 2005]. Die Ergebnisse neuerer umfangreicher epidemiologischer Studien stellen jedoch die Zusammenhänge zwischen Kaffeeconsum und einer verminderten Inzidenz für degenerative Erkrankungen wie Diabetes Typ 2, kardiovaskuläre Krankheiten, Tumorerkrankungen, Alzheimer –Demenz oder Morbus Parkinson dar [Greenberg *et al.*, 2006; Hernan *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2006; Lindsay *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009]. Obwohl ein Teil dieser Erkrankungen erblich bedingt ist, spielen auch die Ernährung und damit auch der Kaffeeconsum eine wichtige Rolle in der Genese. Übermäßige Kalorienzufuhr, mangelnde Bewegung, Umweltfaktoren und daraus resultierende Fettleibigkeit sind Risikofaktoren der oben genannten Krankheiten [Greenberg *et al.*, 2006; Thom, 2007]. Viele der protektiven Wirkungen von Kaffee werden den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie z.B. phenolischen Verbindungen und Alkaloiden zugeschrieben. Diskutiert werden neben Chlorogensäuren (Hauptkomponenten der phenolischen Verbindungen im Kaffee) und deren Röstprodukten auch Kaffeealkaloide wie Trigonellin und das erst kürzlich identifizierte N-Methylpyridinium [Farah *et al.*, 2006; Shearer *et al.*, 2003]. Diese Verbindungen stehen auch im Mittelpunkt dieser Arbeit.

### 3.4.1 Phenolsäuren im Kaffee

Zu einer der Hauptklassen der polyphenolischen Verbindungen zählen Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren, die in fast allen Pflanzen meist an organische Säuren oder Zucker verestert vorkommen. Wichtige Hydroxyzimtsäureester sind Chlorogensäuren, die aus Hydroxyzimtsäuren (Ferulasäure, *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure) und Chinasäure gebildet werden (Abbildung 3-16) [Olthof *et al.*, 2001].



**Abbildung 3-16: Chemische Struktur von Hydroxyzimtsäuren nach [Belitz, 2005]**

Chlorogensäuren findet sich in großen Mengen in Kaffee, Blaubeeren, Äpfeln und einigen Gemüsesorten wie Auberginen und Artischocken [Olthof *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2008]. Kaffee ist die Hauptquelle für Chlorogensäuren in der menschlichen Ernährung. Grüne Kaffeebohnen enthalten die höchste Konzentration an diesen Stoffen (6 bis 12%). Die häufigste in Kaffeebohnen vorkommende Chlorogensäure ist die 5-O-Caffeoylchinasäure (5-CQA) [Maier, 1984], die auch im Fokus dieser Arbeit steht. Daneben liegen die 3-O-Caffeoylchinasäure (Neochlorogensäure, 3-CQA), 4-O-Caffeoylchinasäure (Kryptochlorogensäure, 4-CQA) und die 3,4-, 3,5- und 4,5-Dicaffeoylchinasäure, Feruoylchinasäure und in Spuren *p*-Coumaroylchinasäure vor (Tabelle 3-4) [Farah *et al.*, 2006].

**Tabelle 3-4: Chlorogensäurezusammensetzung grüner Kaffeebohnen [Farah *et al.*, 2006]**

Chlorogensäuren	C. arabica	C.robusta
Caffeoylchinasäuren (CQAs)	80 % <sup>1</sup>	76 % <sup>2</sup>
Dicaffeoylchinasäure	15 %	18 %
Feruloylchinasäure	5,2 %	6,2 %
p-Coumaroylchinasäure	geringe Mengen	geringe Mengen

<sup>1</sup> davon 52 % 5-O-Caffeoylchinasäure

<sup>2</sup> davon 56 % 5-O-Caffeoylchinasäure

In frisch aufgebrühtem Kaffee finden sich Gehalte von 500 – 800 mg/L Chlorogensäuren. Die tägliche Aufnahme bei Kaffeetrinkern beträgt 0,5-1g, während Nicht-Kaffeetrinker nur <100 mg Chlorogensäuren pro Tag aufnehmen [Dupas *et al.*, 2006; Olthof *et al.*, 2001].

#### 3.4.1.1 Bioverfügbarkeit der Chlorogensäuren

##### Resorption

Viele Einzelexperimente *in vitro* und Tierstudien weisen auf eine Vielzahl positiver und antioxidativer Eigenschaften der Chlorogensäuren hin [Lafay *et al.*, 2006; Olthof *et al.*, 2001]. Es ist aber noch unklar, ob diese Wirkung nach der Aufnahme und Metabolisierung dieser Verbindungen im Organismus erhalten bleibt [Higdon and Frei, 2006]. Daher ist es wichtig die Bioverfügbarkeit der Chlorogensäuren zu betrachten.

Resorption und Spaltung der Chlorogensäuren als ein erster Schritt der Metabolisierung konnten im Rahmen der bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig aufgeklärt werden, da deren Bestimmung aufgrund des intensiven bakteriellen Abbaus im Kolon schwierig ist. Für die Aufnahme von freien Phenolsäuren werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen die Aufnahme durch passive Diffusion der protonierten Säure im Magen und zweitens die Beteiligung aktiver Transporter im Dünndarm [Ader *et al.*, 1996; Olthof *et al.*, 2001].

Veresterte Phenolsäuren wie Chlorogensäuren werden wahrscheinlich zu einem Teil in Magen oder Dünndarm als intaktes Molekül absorbiert, wie Studien an Ileostomiepatienten belegen, bei denen eine Aufnahme von 33 % für Chlorogensäuren geschätzt wurde [Olthof *et al.*, 2001]. Ein Großteil der Ester gelangt vermutlich unmetabolisiert in den Dickdarm, wo sie durch die intestinale Mikroflora gespalten und dann absorbiert werden [D'Archivio *et al.*, 2007]. Im Dünndarm nicht

absorbierte phenolische Verbindungen gelangen in den Dickdarm, wo sie nach Metabolisierung und Abbau durch die intestinale Mikroflora ebenfalls aufgenommen werden können. Erscheinen Chlorogensäure-Metaboliten im Plasma, unterliegen sie in der Leber meist weiteren Reaktionen, z.B. mehrfachen Konjugationen. Durch die hohe  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität der Leber können Glucuronide wieder gespalten und biliär durch den enterohepatischen Kreislauf z.B. als methylierte/sulfatierte Konjugate wieder in das Kolon gelangen [Williamson *et al.*, 2000]. In einer von Nardini *et al.* durchgeführten Humanstudie mit Kaffee wurde freie und an Glucuronsäure gebundene Kaffeesäure als einzige phenolische Verbindung in signifikanten Mengen im Plasma gefunden [Nardini *et al.*, 2002]. Gleiche Metabolite wurden nach Konsum von Apfel Cider [DuPont *et al.*, 2002] und nach dem Essen von 100 g Pflaumen [Cremin *et al.*, 2001] im Plasma der Probanden bestimmt. Die von Monteiro *et al.* durchgeführte Studie ist die erste, in der nach der Kaffeeaufnahme neben der Kaffeesäure sechs intakte Chlorogensäure-Verbindungen im Plasma der Probanden identifiziert wurden [Monteiro *et al.*, 2007]. Diese Versuche sprechen für eine schnelle Resorption und Metabolisierung von Chlorogensäuren.

### **Bakterieller Metabolismus in Kolon**

Phenolische Verbindungen erreichen den Dickdarm auf zwei Wegen: entweder passieren sie den Dünndarm unverändert (als Glycosid, Aglycon oder Ester), oder sie werden im oberen Gastrointestinaltrakt absorbiert, als Konjugate in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden und gelangen in dieser Form ins Kolon [Gao *et al.*, 2006]. Ca. 80% der aufgenommenen phenolischen Verbindungen erreichen in freier oder konjugierter Form das Kolon, wo sie durch die intestinale Mikroflora gespalten und dann absorbiert werden [D'Archivio *et al.*, 2007]. Eine Metabolisierung von Chlorogensäuren erfolgt durch Enzyme (Xylanasen, Esterasen) der Mikroflora im Dickdarm. Als Dickdarmbakterien die Chlorogensäuren hydrolysieren können, wurden *E.coli*, *Bifidobacterium lactis* sowie *Lactobacillus gasseri* identifiziert. Zunächst entsteht Kaffeesäure und später Dihydrokaffeesäure (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure) [Rechner *et al.*, 2004]. Nach Resorption der Metabolite im Kolon können sie dehydroxyliert und/oder  $\beta$ -oxidiert werden. Durch Glycinierung entstehen Hippursäurederivate, die als Endprodukte für den Chlorogensäuremetabolismus beschrieben sind (Abbildung 3-17) [Olthof *et al.*, 2003; Rechner *et al.*, 2004]. Das Spaltprodukt der Chlorogensäure, die Kaffeesäure wird dann

im Dickdarm als Benzoessäure resorbiert [Azuma *et al.*, 2000]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass nur 0,3 % der aufgenommenen Chlorogensäure im Urin in Form von freier Kaffeesäure wieder ausgeschieden werden [Olthof *et al.*, 2001], was auf eine weitere Metabolisierung hinweist. In neusten Studien zu Untersuchungen der Bioverfügbarkeit von Chlorogensäuren aus der Kaffee am Menschen wurde neben der Kaffeesäure, niedrigere Konzentration der 5-O-Caffeoylchinasäure, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Dihydroferulasäure und Vanillinsäure als renale Metabolite bestimmt. [Farah *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2007].

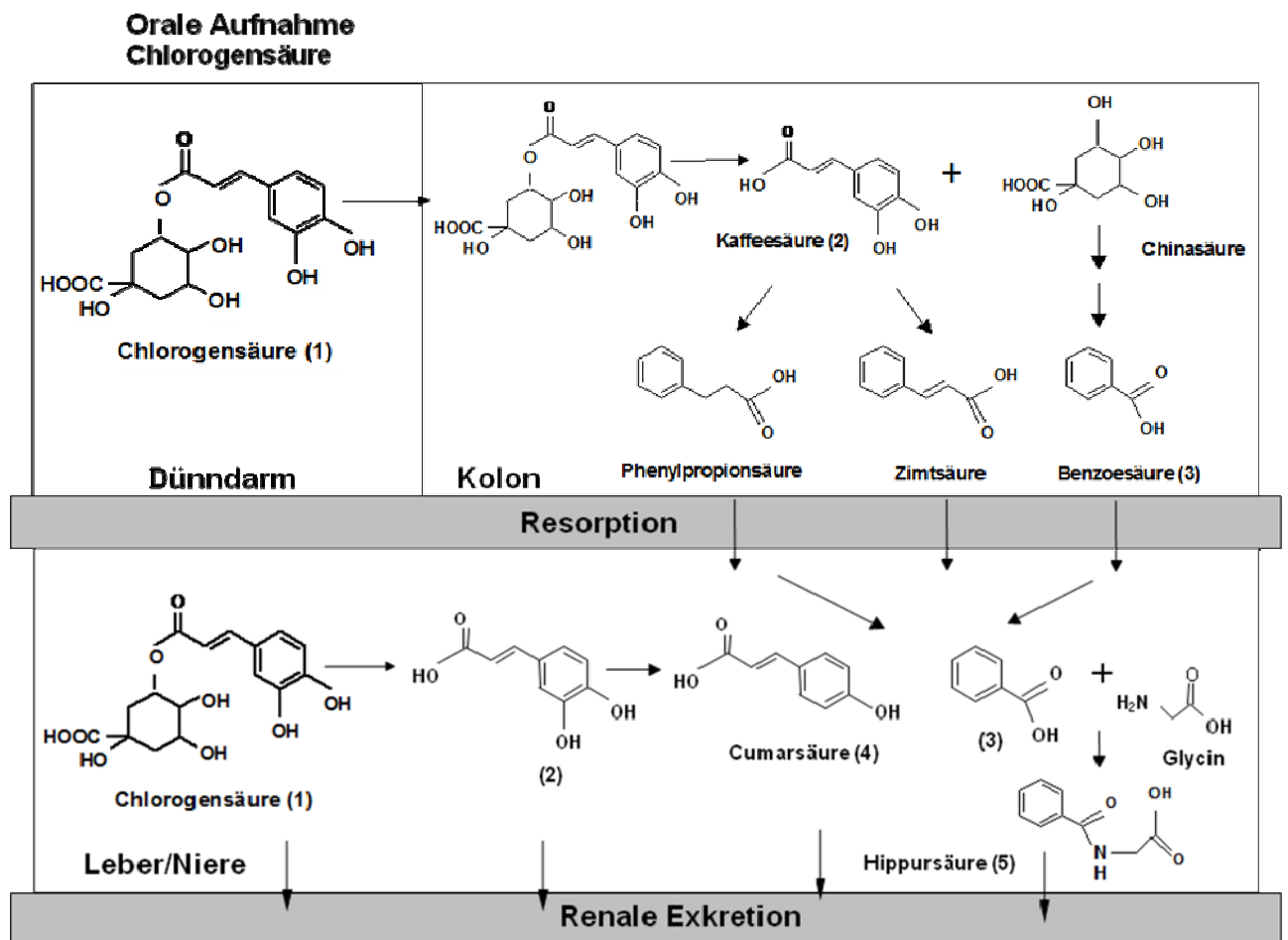


Abbildung 3-17: Metabolismus von Chlorogensäure modifiziert nach [Olthof *et al.*, 2001].

### 3.4.2 Abbauprodukte der Chlorogensäure

Während des Röstprozesses sinkt der Chlorogensäuregehalt in Abhängigkeit vom Röstgrad. So enthält z.B. eine rohe Robusta-Bohne 8,8 % an Chlorogensäuren, dieser Anteil fällt bei einem dunklen Röstgrad auf bis zu 0,2 % ab [Belitz, 2005]. Es ist bekannt, dass die Struktur von phenolischen Verbindungen bei den Temperaturen,

die beim Rösten des Kaffees auftreten (220-250 °C), stark verändert wird [Bekedam *et al.*, 2008; Richelle *et al.*, 2001]: Dabei entstehen verschiedene Reaktionsprodukte wie z.B. bitterschmeckende Chlorogensäurelactone, sowie unterschiedliche Di- und Trihydroxybenzole wie Pyrogallol, Hydroxyhydrochinon, Catechol, 4-Ethylcatechol, 4-Methylcatechol und 4-Allylcatechol als Hauptprodukte (Abbildung 3-18). Catechol ist die dominierende Dihydroxybenzol-Verbindung in geröstetem Kaffee und entsteht als Abbauprodukt der Kaffeesäure und der Chinasäure, die beide bei der Hydrolyse der Chlorogensäure freigesetzt werden. 4-Ethylcatechol wird ebenfalls aus der Kaffeesäure freigesetzt. Es wird angenommen, dass die Trihydroxybenzole Hydroxyhydrochinon und Pyrogallol durch Pyrolyse der Chinasäure gebildet werden. Der Bildungsweg des 4-Methylcatechols und des 3-Methylcatechols ist bisher noch ungeklärt [Muller *et al.*, 2006]. Durch die Untersuchung von drei verschiedenen, mit kochendem Wasser aufgebrihten und mit konventionellen Kaffeefiltern filtrierten Kaffees auf ihren Gehalt an Catechol konnten 3,5 - 7,1 mg bzw. 31,7 - 64,5 µmol Catechol pro Liter Kaffee erfasst werden [Lang *et al.*, 2006]. Zum Gehalt von 1,2,4-Trihydroxybenzol existieren in der Literatur nur wenige Angaben. In einem Modellexperiment mit zwei unterschiedlichen Kaffees wurden von Müller *et al.* 3,1 mg/kg bzw. 24,6 µmol/kg 1,2,4-Trihydroxybenzol in den gerösteten Kaffeebohnen gefunden.

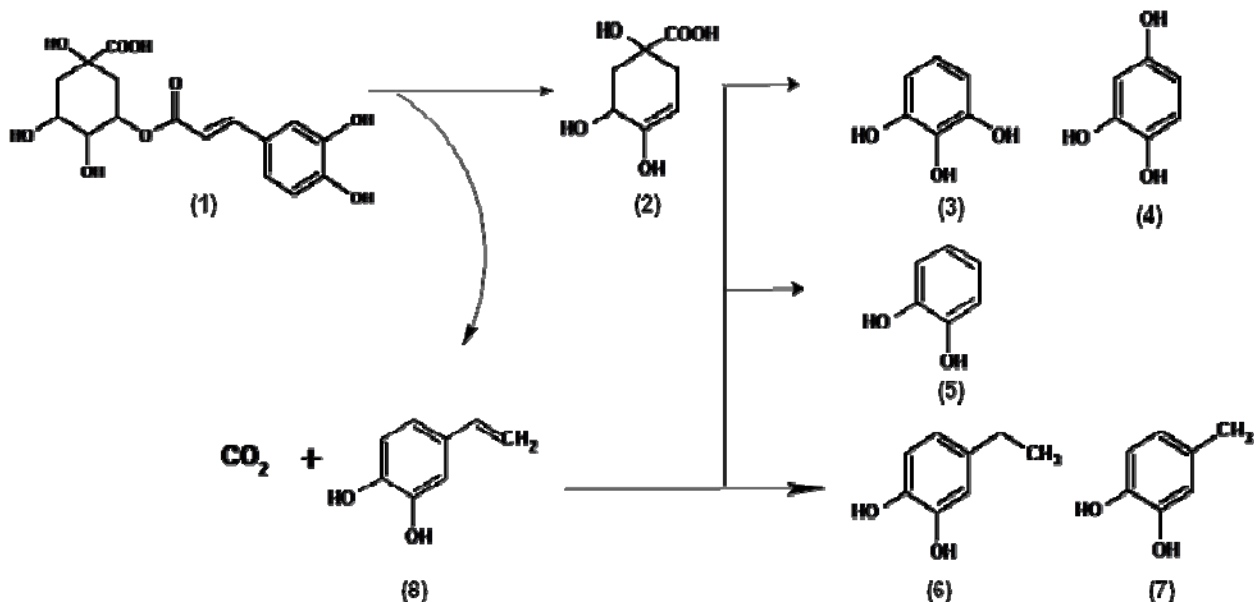


Abbildung 3-18: Thermische syn-Eliminierung der Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) (1): Chinasäure (2), Pyrogallol (3), Hydroxyhydrochinon (4), Catechol (5), 4-Ethylcatechol (6), 4-Methylcatechol (7), 4-Allylcatechol (8); modifiziert nach [Muller *et al.*, 2006]



Obwohl sich der Gehalt vieler antioxidativ wirksamer Substanzen, unter ihnen hauptsächlich die Chlorogensäuren, während des Röstprozesses verringert, bleibt die gesamte antioxidative Wirksamkeit des Kaffeegetränks erhalten oder wird sogar erhöht, da es während des Röstprozesses auch zur Bildung antioxidativ wirksamer Substanzen wie z.B. von Melanoidinen kommt [del Castillo *et al.*, 2002].

### 3.4.3 Antioxidative Wirkung der Phenolsäuren

Antioxidantien sind niedermolekulare Substanzen, die auch in geringer Konzentration oxidativen Veränderungen an Biomoleküle (Proteine, Nukleinsäuren, Lipide) durch reaktive Sauerstoffspezies verhindern oder zumindest verzögern. Antioxidative Eigenschaften der phenolischen Verbindungen sind hinreichend bekannt. Die Wirkung beruht auf der Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen an radikalische ROS und damit auf der Unterbrechung von Radikalkettenreaktion (Abbildung 3-19) [Lemanska *et al.*, 2001].



**Abbildung 3-19: antioxidative Wirkung eines Modellcatechols. der Angriff des Radikals  $R^\bullet$  führt zur Bildung des Semichinons.  $R^1$ : Rest**

Aufgrund ihres ausgedehnten  $\pi$ -Elektronensystems vermögen die Phenolsäuren ein stabiles Radikal zu bilden, wodurch oxidative Prozesse an biologisch wichtigen Strukturen verzögert bzw. verhindert werden [Eisenbrand *et al.*, 2005]. Phenolische Verbindungen mit entsprechender struktureller Voraussetzung sind außerdem in der Lage zum Elektronentransfer und/ oder können Chelate mit Übergangsmetallionen bilden [Pietta, 2000]. Allgemein lässt sich feststellen, dass die antioxidative Wirkung der Phenolsäuren mit der Anzahl der Hydroxylgruppen ansteigt. Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe haben nur eine schwache Wirkung (z.B. *p*-Cumarsäure). Bei den Dihydroxycarbonsäuren nimmt die Wirkung in der Reihenfolge meta, ortho, para zu [Dziedzica, 1984]. Methoxygruppen in benachbarter Position erhöhen die Wirkung wie bei Ferula- und Sinapinsäure. Für eine sehr starke antioxidative Aktivität muss die

Carboxylgruppe vom aromatischen Ring getrennt sein. So zeigen Hydroxyzimtsäuren eine stärkere Wirkung als Hydroxybenzoesäuren.

#### **3.4.4 Biologische Wirkung von Phenolsäuren**

Neben ihrer „direkten“ antioxidativen Wirksamkeit, also dem Abfangen freier Radikale oder der Chelatisierung redoxaktiver Metall-Ionen, zeigen Phenolsäuren eine Reihe „indirekter“ (zellulärer) antioxidativer Effekte. Diese wirken nicht auf die ROS an sich, sondern modulieren die Abwehr der beteiligten Zellen. In den letzten Jahren wurde vermehrt die präventive Wirkung von phenolischen Verbindungen auf die Entstehung verschiedener Erkrankungen auf verschiedenen Ebenen (von *in vitro*-Assays bis hin zu epidemiologischen Studien) untersucht. Die chemopräventive Wirkung von Phenolsäuren lässt sich in zwei Mechanismen einteilen: Blockierung der Initiationsphase oder Unterdrückung der weiteren Wirkung (Promotion, Progression, Angiogenese, Invasion, Metastasierung) [de Kok *et al.*, 2008]. „Blockierende“ Agenzien entfalten ihre protektive Wirkung, bevor Kanzerogene kritische Zellstrukturen (z.B. DNA) erreichen. Sie verhindern die metabolische Aktivierung von Kanzerogenen, fangen ultimale Kanzerogene ab und inaktivieren diese, oder sie erleichtern die Eliminierung aus dem Körper [Lee and Surh, 2005]. „Suppressive“ Verbindungen wirken nach Initiation durch Kanzerogene. Sie greifen hemmend in die prä-maligne und maligne Transformation von initiierten Zellen auf der Stufe der Promotion und Progression ein. Zugrunde liegende Mechanismen sind z.B. Wachstumshemmung, Modulation zellulärer Differenzierung und Apoptose, Erhöhung der Immunantwort sowie Aktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. Inaktivierung von Onkogenen [Lee and Surh, 2005].

#### ***Einfluss auf Fremdstoffmetabolismus***

Enzyme, die in den Fremdstoffmetabolismus involviert sind (Cytochrom-P450-Enzyme und detoxifizierende Phase-II-Enzyme), spielen nicht nur eine Rolle bei der Metabolisierung von phenolische Verbindungen, sie können auch durch diese Verbindungen in ihrer Aktivität beeinflusst werden, so dass potentielle Kanzerogene verstärkt abgefangen werden. Einige Phenolsäuren wie z.B. Chlorogen- und Kaffeesäure beeinflussen die Expression von Cytochrom P450-abhängigen Enzymen, vor allem die Modulation der Isoenzyme CYP 1A1, 2E1 schon auf Genexpressionsebene durch Bindung an den Ah (aryl Hydrocarbon)- Rezeptor.

Dadurch könnte die giftende Wirkung des Phase I-Metabolismus auf viele Kanzerogene verringert werden [Watzl, 2001]. Die detoxifizierenden Phase II Enzyme (s. Kapitel 3.2.3) werden ebenfalls durch phenolische Verbindungen moduliert.

### ***Einfluss auf Zellproliferation***

Die wichtigsten Mechanismen der Eliminierung von Tumorzellen sind Proliferationshemmung und Apoptose Induktion. Phenolische Verbindungen zeigten *in vitro* Studien wachstumshemmende Effekte in Kolonkrebszellen [Calliste *et al.*, 2001; Kern *et al.*, 2005], vor allem während ihrer aktiven Wachstumsphase vor Erreichen ihrer Konfluenz [Agullo *et al.*, 1994]. Angriffspunkte der Verbindungen liegen in der MAP-Kinase-Kaskade, wo sie bereits auf der Ebene des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) eine Hemmung zeigen und damit das Anschalten des weiteren Signalweges verhindern [Kern *et al.*, 2005]. Durch Interaktionen mit dem Aryl-Hydrocarbonrezeptor (AhR) können Signalwege angeschaltet werden, die mit der Zellwachstumshemmung assoziiert sind [Kampa *et al.*, 2004].

Ein weiterer Mechanismus zur Kontrolle des Zellwachstums ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Dieser kann durch verschiedene Faktoren induziert werden, z.B. durch Plasmamembran-Rezeptoren (TNF $\alpha$ , Fas, Glutamat), Störungen der Calcium-Homöostase, Stress (z.B. ROS, Entzug von Wachstumsfaktoren) oder durch DNASchädigung (UV-Licht, p53, Etoposid). An der Regulation der Apoptose sind Proteine der Bcl-2-Familie beteiligt. Zu ihnen gehören Agonisten (z.B. Bax, Bad) und Antagonisten (z.B. Bcl-2, Bcl-XL). Andere Regulationsmechanismen laufen z.B. über Phosphorylierungs-/ Dephosphorylierungsreaktionen, z.B. der Proteinkinase C (PKC). Da mit der Apoptose morphologische Veränderungen einhergehen, z.B. Schrumpfen der Zellen, Chromatinkondensation, Bildung von DNA-Fragmenten („Leiter“) sowie Bildung apoptotischer Körperchen, müssen zuvor eine Reihe von Enzymen aktiviert werden, die, erst einmal aktiv, irreversibel die Apoptose in Gang setzen. Zu ihnen gehören Endonukleasen und Proteasen (Caspasen). Durch vermehrte Expression proapoptotischer bzw. Hemmung antiapoptotischer Proteine sowie durch Modulation von Caspaseaktivität wurden Flavonoide und Polyphenole als Apoptose-induzierende Verbindungen identifiziert [Kampa *et al.*, 2004].

### ***Einfluss auf Entzündungsmarker***

Der Zusammenhang zwischen Entzündungen und Krebs beruht auf der Wirkung von NF $\kappa$ B, TNF und Cyclooxygenase 2 (COX-2) die die Entzündungsreaktion aber auch

das Tumor-Wachstum fördern [Ramos, 2008]. Das induzierbare Enzym COX-2 katalysiert die Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure und ist in vielen Tumorgeweben überexprimiert. Der daraus resultierende Überschuss an Prostaglandinen fördert die Kanzerogenese durch proliferierende, antiapoptotische und angiogene Eigenschaften [Ramos, 2008]. Eine Hemmung von COX-2 kann durch Flavonoide wie Quercetin oder seine Metaboliten Isorhamnetin und Tamarixetin erreicht werden [Jones *et al.*, 2004]. Außerdem hemmt Quercetin die induzierbare NO-Synthase (iNOS), ein Enzym welches eng mit Entzündungsreaktionen im Körper assoziiert ist [Gonzalez-Gallego *et al.*, 2007].

### **Adverse Effekte**

Polyphenole haben reaktive, funktionelle Gruppen, so dass nicht nur antioxidative und protektive, sondern auch adverse Effekte, z.B. prooxidative Wirkung, zu erwarten sind; das heißt eine Bildung von ROS, was dem antioxidativen Charakter dieser Verbindungen eigentlich widerspricht, aber vermutlich auf denselben Mechanismen - Oxidation der 3'4'-Dihydroxystruktur zum *o*-Catechol beruht. Durch diese Oxidation kann molekularer Sauerstoff zum Superoxidaradikal-Anion oder dieses zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert werden. Eine Strukturvoraussetzung für eine Chinonbildung ist die Catecholgruppe, wie sie z.B. bei Kaffeesäurederivaten vorliegt. Polyphenole, wie z.B. Quercetin, sind gut auf ihre adverse Wirkung untersucht [Metodiowa *et al.*, 1999]. Die relevanten Strukturmerkmale sind dort die freie Hydroxylgruppe an C3, die Doppelbindung an C2-C3 mit der Ketogruppe an C4 und auch die Catecholgruppe im B-Ring. Aufgrund ihrer Fähigkeit zum Redox-Cycling zeigen sie unerwünschte Eigenschaften, die in erster Linie auf ihre elektrophilen Metabolisierungsprodukte (Chinone, Methide) zurückzuführen sind. Es besteht die Möglichkeit einer Chinonbildung oder die einer Adduktbildung mit Glutathion. Durch die Aduktbildung wird der zelluläre Glutathionspiegel verringert; die Zellen sind dadurch anfälliger für oxidative Schäden, da ein wichtiger antioxidativer Abwehrmechanismus wegfällt.

### **3.4.5 Alkaloide im Kaffee**

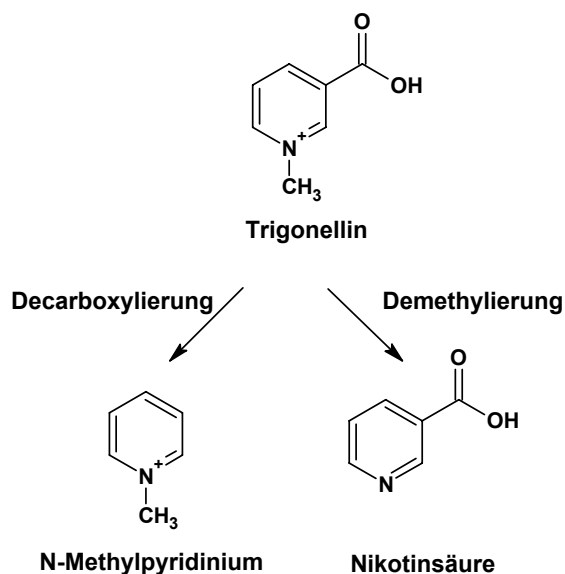
Alkaloide sind stickstoffhaltige Natursubstanzen, die in bestimmten Pflanzengattungen vorkommen. Beim Kaffee ist an erster Stelle als das am meisten untersuchten Alkaloid das Koffein zu nennen, das je nach Sorte zwischen 0,8 und 2,5 % Anteil ausmachen kann. Durch den Röstvorgang ändert sich der Koffeingehalt so gut wie nicht [Kaffeeverband]. Im Hinblick auf potentielle antioxdativer Wirksamkeit

stehen in dieser Arbeit andere Alkaloide des Kaffees wie Trigonellin sowie seine Röstprodukte N-Methylpyridinium (NMP) und methylierte NMP-Analoga im Vordergrund.

### 3.4.5.1 Trigonellin

Trigonellin (N-Methylnicotinsäure) ist nach Koffein das mengenmäßig wichtigste Alkaloid in grünen Kaffeebohnen. Im Rohkaffee liegt die Konzentration von Trigonellin in *Coffea arabica* und *robusta* zwischen 7.9 und 10.6 g/kg, wobei im Röstprozess 50 % abgebaut werden. Neben diversen Geschmacks- und Aromastoffen geht aus Trigonellin das einzige im Kaffee enthaltene Vitamin, das Niacin, hervor (Abbildung 3-20). Unter den Begriff „Niacin“ fallen Nicotinsäure sowie das Nicotinsäureamid, die als „*Pellagra preventive factor*“ bzw. Vitamin B3 bekannt sind. Röstkaffee stellt eine bedeutende Quelle für Niacin dar, das bei enzymatischen Prozessen als Bestandteil der Coenzyme Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP<sup>+</sup>) eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Wasserstoff spielt. Beim Abbau des Trigonellins stehen die Decarboxylierung zum N-Methylpyridinium-Ion (NMP, s. 3.4.5.2) mit folgender Umlagerung der Methylgruppe zu verschiedenen Pyridin-Verbindungen sowie die N-Demethylierung zur Nicotinsäure im Vordergrund. Nicotinsäure (6,1 %) und Pyridin (5,3 %) sind die Hauptabbauprodukte des Trigonellins. Der Nicotinsäuregehalt der Rohkaffeebohne ist gering (8-17 mg/kg); aufgrund der N-Demethylierung des Trigonellins ab Temperaturen von 180°C steigt der Nicotinsäuregehalt jedoch so deutlich an, dass durch einen Konsum von 3,5 Tassen Kaffee pro Tag der Nikotinsäurebedarf eines Erwachsenen zu einem Drittel gedeckt werden kann [Stadler *et al.*, 2002a; Stennert and Maier, 1993].

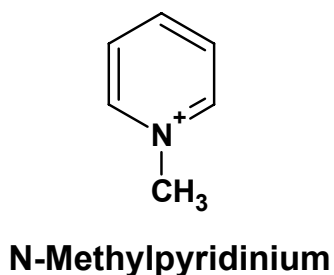
Kaffeetrinker sind täglich einer durchschnittlichen Exposition von 13,8 - 45,7 µmol Trigonellin ausgesetzt. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit geht man von einer recht schnellen Aufnahme von Trigonellin aus. Bisher wurden jedoch noch keine Untersuchungen über den Trigonellingehalt in Plasma gemacht. Hirakawa *et al.* unterstützt anhand der Ergebnisse von Fütterungsversuchen mit Ratten die Annahme, dass Trigonellin über den Gastrointestinaltrakt gut aufgenommen wird. [Hirakawa *et al.*, 2005].



**Abbildung 3-20: Decarboxylierung und Demethylierung von Trigonellin zu N-Methylpyridinium (NMP) bzw. Nikotinsäure [modifiziert nach Stadler et al., 2002a].**

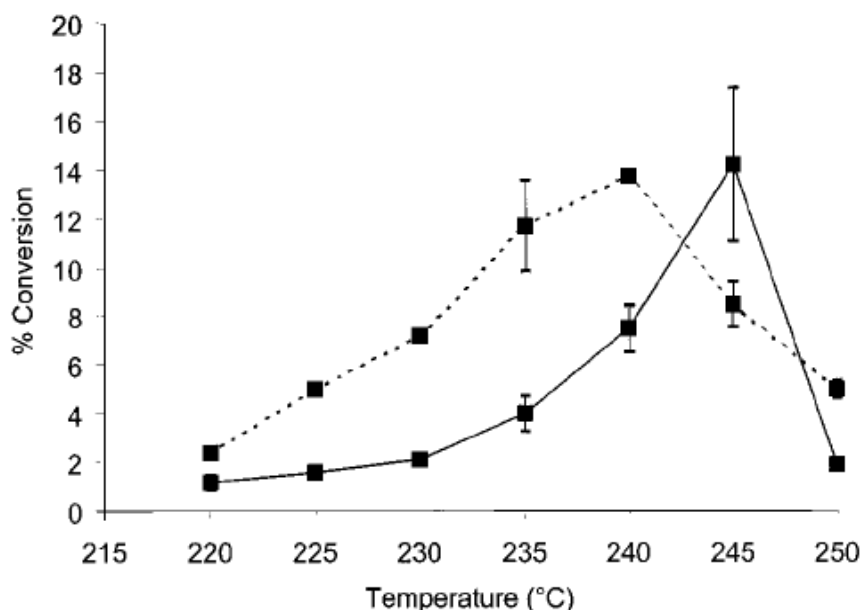
#### 3.4.5.2 N-Methylpyridinium (NMP) und Abbauprodukte

Eines der Hauptreaktionsprodukte des Trigonellinabbaus während des Röstprozesses ist das N-Methylpyridinium-Ion (NMP) (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21: Chemische Struktur des N-Methylpyridinium-Ions [Somoza et al., 2003].**

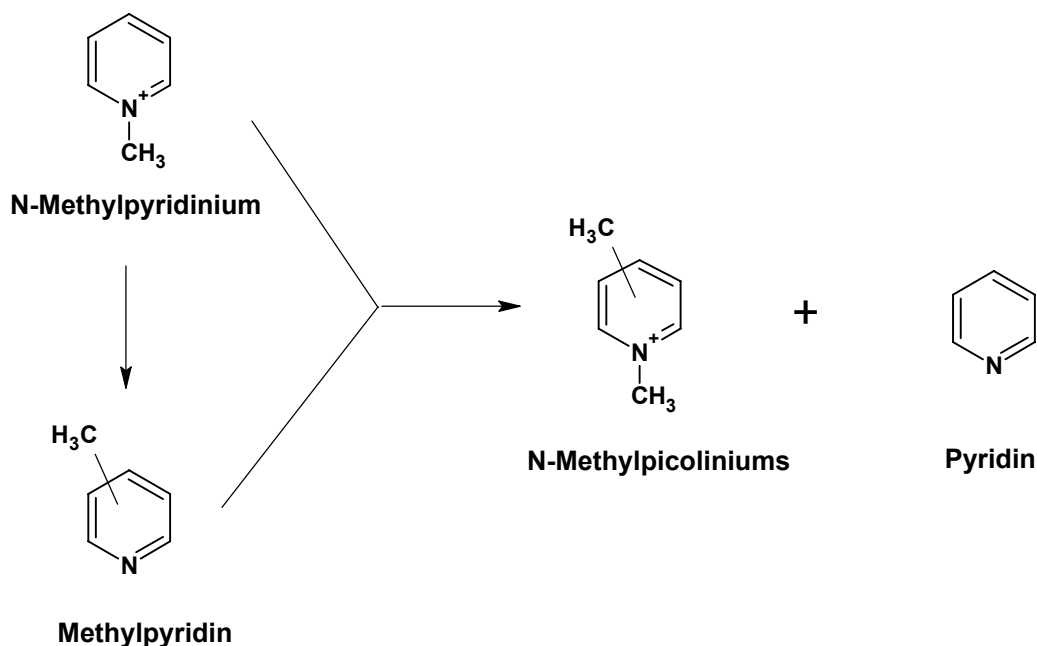
Die Menge des während des Röstprozesses gebildeten NMPs ist abhängig vom Röstgrad und liegt zwischen 0,06 und 0,25 Gew.-%. In einem Temperaturbereich von 220 bis 245 °C nimmt die NMP-Bildung zu, während sein Gehalt ab einer Temperatur von 250°C wieder abfällt (Abbildung 3-22) [Stadler et al., 2002b].



**Abbildung 3-22:** Bildung der N-Methylpyridinium (durchgezogene Linie) und Nicotinsäure (gestrichelte Linie) aus Trigonellin in Abhängigkeit von der Temperatur. Angegeben ist die Prozentuale Umwandlung auf molarer Basis. Pyrolysedauer= 15 min, n=3 [Stadler et al., 2002b]

Stadler *et al.* gehen bei einem Konsum von bis zu 5 Tassen Kaffee/Tag von einer durchschnittlichen Aufnahme von 30 - 125 mg bzw. 0,3 - 1,3 mmol NMP/Person/Tag aus, da aufgrund der stark polaren Eigenschaft von NMP eine gute Löslichkeit in Wasser anzunehmen ist [Stadler *et al.*, 2002b]. Der Kooperationspartner AG Hofmann (TU München) konnte zeigen, dass bereits nach 4 h etwa 50 % des oral aufgenommenen NMPs im Urin wieder gefunden werden konnte. Nach fünf Tagen waren 62 % der aufgenommenen NMP-Menge über den Urin ausgeschieden. Somit scheinen etwa 50 % des NMPs aufgenommen worden zu sein, was die von Stadler *et al.* postulierte leichte Aufnahme unterstützt, es ist aber noch nicht geklärt wie die Metabolisierung verläuft.

NMP kann im weiteren Verlauf der Röstung über Methylpyridin zu verschiedenen *N*-Methylpicolinium- Verbindungen und Pyridin abgebaut werden. Dabei kommt es je nach Position der Methylgruppe am Pyridinring zu 1,2-, 1,3-, oder 1,4 *N*-Methylpicolinium (Abbildung 3-23) [Stadler et al., 2002b].



**Abbildung 3-23: Entstehung von N-Methylpicolinium [modifiziert nach Stadler *et al.*, 2002a und b].**

N-Methylpicoliniums werden bei einem durchschnittlichen Kaffeekonsum von fünf Tassen Kaffee pro Tag in einer Konzentration von 1,9 - 10,4  $\mu\text{mol}$  aufgenommen [Stadler *et al.*, 2002b]. Studien über die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen liegen derzeit noch nicht vor. Aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit scheint eine gute Bioverfügbarkeit jedoch ebenfalls wahrscheinlich.

Chemopräventive und antioxidative Wirkung von NMP als Kaffeeinhaltsstoff wurde in von Somoza *et al* durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben [Somoza *et al.*, 2003]. Die Untersuchungen mit Caco-2 Zellen zeigten sowohl eine Erhöhung der Aktivität der Phase II-Enzyme Glutathion-S-Transferase (GST) und UDP-Glucuronosyl-S-Transferase als auch eine Verminderung des Phase I-Enzyms NADPH Cytochrom C-Reduktase nach Inkubation mit NMP. Eine 15-tägige Fütterungsstudie an Ratten zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase und der UDP-Glucuronosyl-S-Transferase und es konnte zusätzlich ein Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma der Tiere beobachtet werden. Bisher ist noch ungeklärt, ob Metabolite des NMP oder das NMP selbst für die chemopreventive Wirkung durch die Induktion der Phase II-Enzym-Aktivität verantwortlich ist. Diskutiert wird eine Metabolisierung des NMP durch intestinale Mikroorganismen zu einer aktiven Substanz oder eine mögliche Wirkung des NMP



selbst durch die Bindung an spezifische Zellmembran Rezeptoren wie den arylhydrocarbon receptor (AhR) [Somoza *et al.*, 2003].

Iba *et al.* (2000) stellten einen chemopräventiven Einsatz von NMP in Frage, da sie durch einmalige intraperitoneale Verabreichung von 2,5 mmol NMP/kg Körpergewicht an Ratten eine Induktion des Phase I-Enzyms CYP1A1 beobachten konnten. In dieser hohen Konzentration verabreicht induzierte NMP sowohl die CYP1A1-Aktivität, als auch die Gehalte an CYP1A1-Protein und -mRNA, in Leber, Lunge und Nieren der Ratten [Iba *et al.*, 2000]. Eine Induktion von Phase I-Enzymen ist aufgrund einer möglichen Erhöhung reaktiver Metabolite eher unerwünscht. In einer späteren Studie konnte die gezeigte Erhöhung der CYP1A1-Aktivität in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 jedoch nicht bestätigt werden [Iba *et al.*, 2002]. Diese Ergebnisse deuten an, dass das NMP die Genexpression und die Aktivität Xenobiotika metabolisierender Enzyme beeinflusst. Diese Hypothese wird durch weitere Studien unterstützt: Untersuchungen mit den strukturverwandten Picolinen zeigen, dass die Expression verschiedener Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYP 2B und 2E1, in Rattenleber) und GST (HepG2 Zellen) erhöht wird [Dierickx, 1994; Murray *et al.*, 1997].

### **3.5 Kaffeeextrakte**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neben drei aus handelsüblichen Rohkaffeeprovenienzen hergestellten Kaffees mit mittlerem Röstgrad Arabica Columbia (AC), Arabica Brazil (AB) und Robusta India (RI) ein besonders stark gerösteter (Arabica Brazil AB 2) sowie ein schwach gerösteter Kaffee (Arabica Brazil AB 1) von AG Prof. Hofmann (TU München) zur Gewinnung und Lyophilisierung von Extrakten eingesetzt.

Die drei Kaffees AC, AB, RI wurden auf einen vergleichbaren mittleren Röstgrad mittels eines Rotations-Fließbett-Rösters (RFB-Röster) geröstet, so dass Einflüsse auf die Gehalte an den untersuchten Inhaltsstoffen durch veränderte Röstbedingungen ausgeschlossen werden können. Die Extrakte AB 1 und AB 2 wurden aus Rohkaffee bei einer gehaltenen Temperatur über zwei verschiedene Zeiträume geröstet. Bei AC, AB und RI zeigen sich nur kleine Unterschiede in den Gehalten von NMP und Chlorogensäuren (Caffeoylchinasäuren, CQAs), im

Gegensatz dazu zeichneten sich AB 1 und AB 2 durch inverse Konzentrationen an CQAs und NMP aus (Tabelle 3-5).

Zur Herstellung der Kaffeeextrakte wurde 48 g Kaffeepulver in einen Filter eingewogen, 900 ml dest. Wasser in den Wasserbehälter der Kaffeemaschine gegeben und die erhaltenen ca. 800 ml Getränk wurde gefriergetrocknet.

**Tabelle 3-5: Zusammensetzung und Ausbeute der Kaffeeextrakte [persönliche Mitteilung TU München]**

<b>Kaffeeextrakte</b>	<b>Ausbeute [g/l]</b>	<b>5-CQA [mg/l]</b>	<b><math>\Sigma</math>-CQA [mg/l]</b>	<b>NMP [mg/l]</b>
Arabica Brazil	17,68	693,45	1361,6	26,70
Arabica Columbia	17,87	743,14	1408,5	21,47
Robusta India	19,16	639,54	1327,8	29,67
AB 1E	14,05	714,81	1606,5	9,08
AB 2E	15,27	90,51	185,1	70,53

### 3.6 Studienkaffees

Im Rahmen des Projektes wurde eine **Pilotstudie** (AG Somoza, TU München) an gesunden Probanden mit zwei unterschiedlichen, nicht handelsüblichen Kaffeegetränken durchgeführt. Dazu wurden vom Arbeitskreis von Prof. Eggers (TU Harburg) Kaffeebohnen (Arabica-Brazil) mit unterschiedlicher Intensität geröstet und im Anschluss vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Hofmann (TU München) in dem daraus hergestellten Kaffeegetränk die CQAs und NMP quantifiziert. Je länger die Kaffeebohnen geröstet wurden, desto stärker sank der Gehalt an CQAs während der Gehalt an NMP zunahm. In den Pilotstudien wurden daher Kaffeeproben für den Konsum durch Probanden ausgewählt, die jeweils hohe Anteile von CQAs (AB 1 Kaffee) bzw. NMP (AB 2 Kaffee) aufweisen. AB 1 (2 min Röstung) und AB 2 (5 min Röstung) zeichneten sich durch inverse Konzentrationen an CQA und NMP aus. AB 1 enthielt wenig NMP (5,4 mg/l) neben viel CQAs (1606,5 mg/l), AB 2 zeigte das entgegengesetzte Bild (NMP 71,2 mg/l, CQAs 185,1 mg/l).

Zur Durchführung der **zweiten Humanstudie** (AG Eisenbrand, TU Kaiserslautern) wurde nun ein Kaffee ausgewählt, der einen ähnlich hohen NMP-Gehalt wie der entsprechende AB 2 der Pilotstudie, gleichzeitig jedoch gegenüber AB 1 einen

deutlich erhöhten CQA-Gehalt aufweist, und daher insgesamt als wirkstoffreich charakterisiert ist. Es handelte sich um eine Mischung aus zwei unterschiedlich gerösteten Kaffees (Arabica-Brazil), die sich zu 25 % aus einer Wirbelschichtröstung und zu 75 % aus einer Trommelröstung zusammensetzt. Standardkaffeegetränke wurden auf verschiedene relevante Komponenten analysiert (AG Hofmann). Neben den Chlorogensäuren (CQAs) wurden Coffein und N-Methylpyridinium (NMP) sowie verschiedene Nicotinsäurederivate quantitativ bestimmt. Der Feststoffgehalt nach Lyophilisieren betrug 15,3 g pro Liter Kaffeegetränk. Der eingesetzte Kaffee verfügt über den Koffeingehalt eines handelsüblichen Normalkaffees. Die Menge an **ΣCQA** liegt bei **580 mg/l**. Vitamin B3, berechnet als Summe aus Nicotinsäure und Nicotinamid, liegt mit 13 mg/l ausreichend hoch, um durch Konsum von 3 Tassen von jeweils 150 ml etwa ein Drittel des durchschnittlichen Tagesbedarfs (~15-17 mg) zu decken. Die Konzentration an **N-Methylpyridinium** ist mit **71,7 mg/l** (0.76 mmol/l) um den Faktor 2 höher als typischerweise in handelsüblichen Röstkaffees gemessen.

### **3.7 Testmethoden**

#### **3.7.1 Zellsysteme**

##### **3.7.1.1 HT-29 Zellen**

Die Zelllinie HT-29 wurde als erste Kolontumorzelllinie 1964 von Fogh aus einem Adenokarzinom eines 44-jährigen Kaukasiers gewonnen und etabliert. Sie ist adhärent wachsend mit einer Verdopplungszeit von 40-60 h [DSMZ, 2004] und zeichnet sich im undifferenzierten Zustand durch einen hohen Glukosekonsum aus. HT-29 Zellen zeigen keinerlei spezifischen Charakteristika von epithelialen Intestinalzellen. Durch Zugabe von Butyrat oder Austausch von Glukose gegen Galaktose lassen sich diese Zellen redifferenzieren, so dass sie einen Bürstensaum und tight junctions ausbilden [Zweibaum, 1991]. Haupteinsatzgebiete dieser Zelllinie sind Untersuchungen zu Glukosemetabolismus und zu Hormonrezeptoren, z.B. EGF, Neutensin oder Prostaglandine. Durch die Möglichkeit zur Differenzierung eignen sich HT-29 Zellen ebenfalls zur Aufklärung molekulare Mechanismen zu deren Modulation [Rousset, 1986].

### 3.7.1.2 *Caco-2 Zellen*

Die Zelllinie Caco-2 entstammt einem menschlichen Adenokarzinom und wurde aus dem Kolon eines männlichen 72-jährigen Kaukasiern gewonnen [DSMZ, 2004]. Sie ist eine adhärent wachsende, d.h. als Monolayer zu kultivierende, Zelllinie und zeigt sowohl spezialisierte enterozytische als auch kolonozytische Zellfunktionen. Die Zellen exprimieren viele intestinale Enzyme mit zur normalen Kolonmukosa vergleichbaren Aktivitäten [Duthie and Dobson, 1999]. Ihre geringe Aktivität an Cytochrom P450 ist ähnlich zu humanen Dickdarmzellen. Einige Phase-II- Enzyme zeigen katalytische Eigenschaften, die mit denen des menschlichen Dünndarms vergleichbar sind [Prueksaritanont *et al.*, 1996]. Expressionsraten von UDPGT1A1 und GST sind geringer als in primärem humanen Enterozyten [Petri *et al.*, 2003]. Eine Besonderheit der Zelllinie Caco-2 ist die fehlende Aktivität des Enzyms NQO1, die sie im Vergleich zu anderen Zellen (z.B. HT-29) deutlich empfindlicher gegen Menadion-induzierten oxidativen Stress machen [Karczewski *et al.*, 1999]. Außerdem sind sie in der Lage, Vitamine, Ionen und Glukose zu transportieren. Caco-2-Zellen werden üblicherweise in Untersuchungen zu Stoffmetabolismus, Genotoxizität, Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf Eisenverfügbarkeit, Calciumtransport und Bürstensaumenzym-Aktivitäten herangezogen. Trotz einiger Unterschiede zu normalen Darmepithelzellen sind Caco-2 Zellen bis heute das Modell der Wahl zur Untersuchung des intestinalen Transports und zur Toxikologie von Fremdstoffen sowie deren präsystemischen Metabolismus [Sambruy *et al.*, 2001].

### 3.7.1.3 *Blut*

Etwa 8% des Körpergewichts macht das Blut aus. Es besteht aus dem Blutplasma und den Blutzellen: Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) [Faller, 1999].

#### ***Erythrozyten (4,5-5,5 Mio/ $\mu$ L Blut)***

Sie entstehen im roten Knochenmark aus den kernhaltigen Stammzellen und bestehen fast ausschließlich aus Hämoglobin, welches O<sub>2</sub> reversibel binden kann. Sie haben eine scheibenförmige Gestalt und sind beidseitig eingedellt. Nach ca. 120 Tagen werden sie in Milz und Leber abgebaut. Ihre Hauptfunktion ist der Transport der Atemgase.

### ***Leukozyten (4.000-8.000 / $\mu$ L Blut)***

Die weißen Blutkörperchen lassen sich in Granulozyten, die Lymphozyten und die Monozyten unterteilen. Sie bilden zusammen mit den lymphatischen Organen das Immunsystem und besitzen amöboide Eigenbeweglichkeit, mit deren Hilfe sie die Wände der Blutkapillaren durchwandern können. Ihre Bildung erfolgt ebenfalls im roten Knochenmark. Die Granulozyten unterteilen sich ihrerseits aufgrund der Anfärbbarkeit der Granula noch einmal in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Sie besitzen alle einen charakteristischen, mehrfach segmentierten Kern. Die Neutrophile (60-70% der Leukozyten) sind Fresszellen der unspezifischen Immunabwehr, die Eosinophile (2-3% der Leukozyten) haben als Zellen der unspezifischen Abwehr die Aufgabe, die Antigen-Antikörper-Komplexe zu phagozytieren, während die Basophile (0,5-1% der Leukozyten) für die Auslösung allergischer Reaktionen durch Histamin und die Blutgerinnungshemmung durch Heparin verantwortlich sind. Die Lymphozyten (20-30% der Leukozyten) sind die Zellen der spezifischen Immunabwehr (zelluläre u. humorale Abwehr), deren Reifung als T-Lymphozyten im Thymus und als B-Lymphozyten im Knochenmark erfolgt. Die T-Lymphozyten stimulieren (T-Helferzellen) oder hemmen (T-Suppressorzellen) das Immunsystem und zerstören (T-Killerzellen) körpereigene virusinfizierte oder entartete Zellen in direktem Kontakt. Die B-Lymphozyten sind vor allem in die Antigenpräsentation eingebunden. Die Monozyten (4-5% der Leukozyten) verlassen nach 20-30 h das Blutgefäßsystem und bilden sich im Gewebe zu Makrophagen um. Sie stellen Zellen der unspezifischen Immunabwehr (Phagozytose u. lysosomale Verdauung) mit Beteiligung an der spezifischen Abwehr (Antigenpräsentation) dar.

### ***Thrombozyten (150.000-350.000 / $\mu$ L Blut)***

Die Blutplättchen entstehen im Knochenmark aus Riesenzellen, die als kernlose Plättchen ins Blut ausgeschwemmt werden. Ihre Aufgabe ist die Blutstillung und Auslösung der Blutgerinnung, indem sie sich bei Verletzungen an der Gefäßwand ablagern, zerfallen und dabei Enzyme freisetzen. Nach 5-10 Tagen werden sie in der Milz abgebaut.

### ***Blutplasma***

Hierbei handelt es sich um Blut ohne Blutzellen. Es besteht zu 90% aus Wasser und zu 10% aus gelösten Stoffen, von denen 70% Plasmaproteine (Albumine,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Globuline), 20% niedermolekulare Stoffe (Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte,

Vitamine, Spurenelemente, Hormone, Enzyme) und 10% Elektrolyte (Na-, Ca-, Cl-, K-, Mg-, PO<sub>4</sub>-Ionen) sind. Die Hauptaufgabe des Plasmas sind Transportvorgänge und die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes. Im Unterschied zu Plasma wird Serum durch Zentrifugation von geronnenem Blut, bei dem die zellulären Bestandteile zu einem sogenannten Blutkuchen verbacken sind, gewonnen [Dörner, 2001]. Als Blutserum wird Blutplasma ohne den Gerinnungsfaktor Fibrinogen bezeichnet.

### **3.7.2 Induktion von moderaten oxidativen Stress**

Im *in vitro* Zellsystem sind Basisschäden durch oxidativen Stress meist in derart geringen Mengen vorhanden, dass es mit den gewählten Methoden fast unmöglich ist, verringernde Effekte durch Antioxidantien zu untersuchen. Daher ist es notwendig, sich einer zusätzlichen Inkubation zu bedienen, in der moderater Stress erzeugt wird. Das Zweistufenprotokoll basiert auf einer Vorinkubation mit den Antioxidantien und einer sich anschließenden Behandlung mit dem Oxidans. Dadurch wird zum einen gewährleistet, dass nur die Antioxidantien, die in die Zelle gelangen, Wirkung zeigen und zum anderen verhindert, dass abfangende Reaktionen bereits im Medium stattfinden können. Das Ausmaß des oxidativen Stresses soll in einem Bereich liegen, der auch *in vivo* bei pathologischen Situationen auftreten kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Oxidantien verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

#### **3.7.2.1 Menadion**

Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon, Abbildung 3-24) ist ein gut untersuchtes, synthetisches Vitamin-K-Analogon ohne isoprene Seitenkette [Eisenbrand *et al.*, 2005]. Es kann im Darm durch die Mikroflora aus Vitamin K gebildet werden.

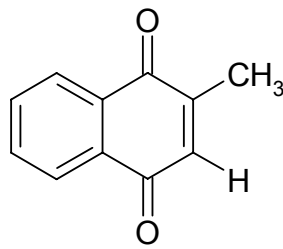


Abbildung 3-24: Strukturformel von Menadion.

Menadion kann wie alle *p*- und *o*-Chinone einer Ein-Elektronen- oder Zwei-Elektronen-Reduktion unterliegen (Abbildung 3-25).

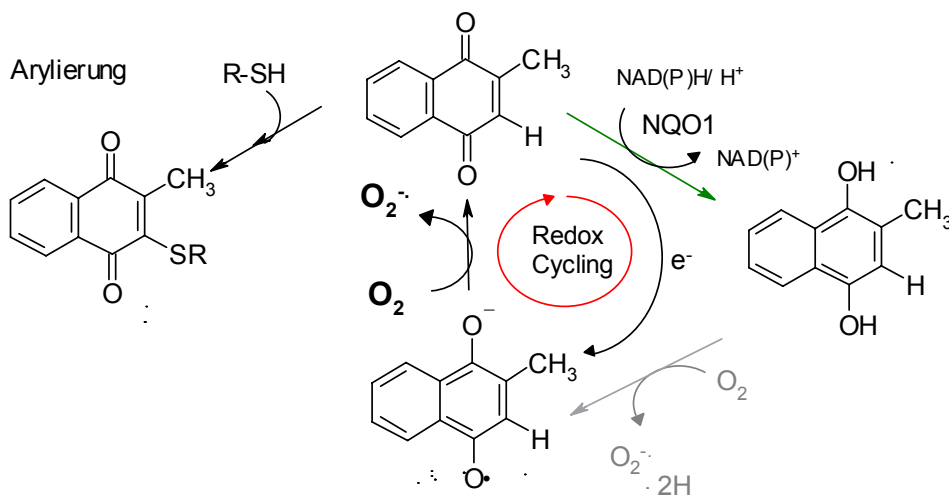


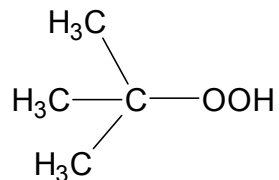
Abbildung 3-25: Redox-Cycling von Menadion nach [Klotz *et al.*, 2002].

Bei der Ein-Elektronen-Reduktion entsteht ein Semichinonradikal. Die Oxidation eines solchen Semichinonradikals durch molekularen Sauerstoff führt zur Regeneration zurück zur Ausgangsverbindung unter gleichzeitiger Bildung eines Superoxidanions, das vor allem enzymatisch zu Wasserstoffperoxid dismutiert [Aherne and O'Brien, 2000; Sun *et al.*, 1997]. In einer sich anschließenden Fenton-Reaktion mit Eisen als Katalysator kann dann das noch viel reaktivere Hydroxylradikal gebildet werden. Während 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon nur über das Redox-Cycling seine toxische Wirkung entfaltet, kann Menadion auch über Arylierung oxidativen Stress verursachen. Durch die Adduktbildung mit Glutathion über eine Art Michael-Addition der Sulfhydrylgruppen [Boatman *et al.*, 2000] wird GSH der antioxidativen Abwehr entzogen und andere Elektrophile und ROS können nicht mehr durch GSH abgefangen werden. Die gebildeten GSH-Chinonaddukte können wieder zum Semichinon reduziert werden und damit durch Redox-Cycling

Superoxidanionradikale bilden [Monks *et al.*, 1992]. Neben Arylierung und Redox-Cycling beeinflusst Menadion verschiedene Stress responsive Signalkaskaden, z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) oder Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K/Akt-Kaskade) [Abdelmohsen *et al.*, 2003]. Arylierungsreaktionen von Menadion mit Cysteinresten von Tyrosinphosphatasen führen zu deren Inaktivierung und zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung. Dadurch wird die „extrazelluläre Signal-regulierte Kinase“ (ERK1 und ERK 2) aktiviert [Klotz *et al.*, 2002].

### 3.7.2.2 *tert*-Butylhydroperoxid (TBH)

*tert*-Butylhydroperoxid (TBH) ist ein organisches Hydroperoxid (Abbildung 3-26).



**Abbildung 3-26: Struktur von *tert*-Butylhydroperoxid.**

Die Toxizität von TBH beruht auf zwei Mechanismen:

1. Reduktion durch GPx nach der Gleichung (3.13)



Dies führt zu einer Störung der Glutathionhomöostase und zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration, was letztlich zu Schäden an der Membran führen kann [Bartoli *et al.*, 1994]. Störungen des Calciumgleichgewichts werden häufig in Zellen beobachtet, die oxidativem Stress unterliegen. Ein Teil der Ionen wandert in den Kern, wo Nukleasen aktiviert werden, die DNA-Schäden induzieren [Meneghini, 1997].

2. Bildung von ROS

Durch Dekomposition des organischen Peroxids kann das Peroxyl- ( $\text{ROO}\cdot$ ) oder das Alkoxyl- ( $\text{RO}\cdot$ )-Radikal gebildet werden, erleichtert durch Anwesenheit von Metallionen, z.B. Methämoglobin oder durch Cytochrom P-450 (in Mikrosomen). Die beiden Spezies können  $\text{H}\cdot$  von anderen Molekülen abstrahieren und spielen bei der

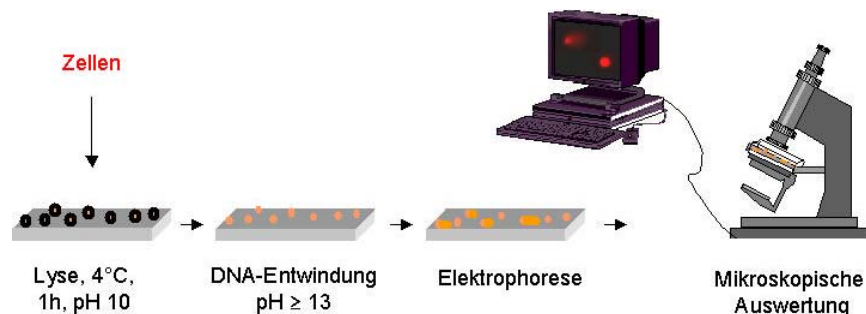


Lipidperoxidation eine große Rolle [Halliwell and Gutteridge, 1999]. Außerdem kann durch Fenton-Reaktion das hochreaktive  $\text{HO}\cdot$  gebildet werden [Bartoli *et al.*, 1994].

### 3.7.3 Detektion (oxidativer) DNA-Schädigung (Comet Assay)

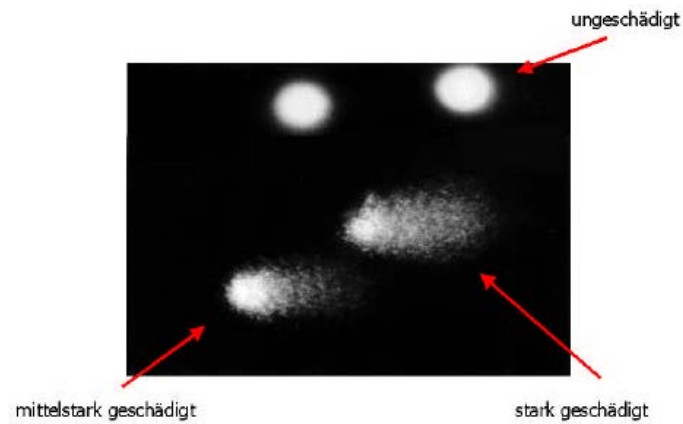
Zur Detektion von DNA-Strangbrüchen wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, herangezogen. Der Comet Assay ist auf eine Beobachtung von Rydberg und Johanson zurückzuführen, dass durch ionisierte Strahlung geschädigte Zellkerne mit zunehmender Dosis im Mikroskop immer diffuser erschienen [Rydberg, 1978]. Ostling und Johanson entwickelten daraus eine Technik, bei der die DNA durch Elektrophorese in Abhängigkeit von der Strahlendosis unterschiedlich weit aus dem Zellkern heraustrat [Ostling and Johanson, 1984].

Zur Durchführung des Comet Assay werden die zu untersuchenden Zellen in ein Agarosegel eingebettet und lysiert. Anschließend wird in einer Elektrophoresekammer unter alkalischen Bedingungen die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 3-27).



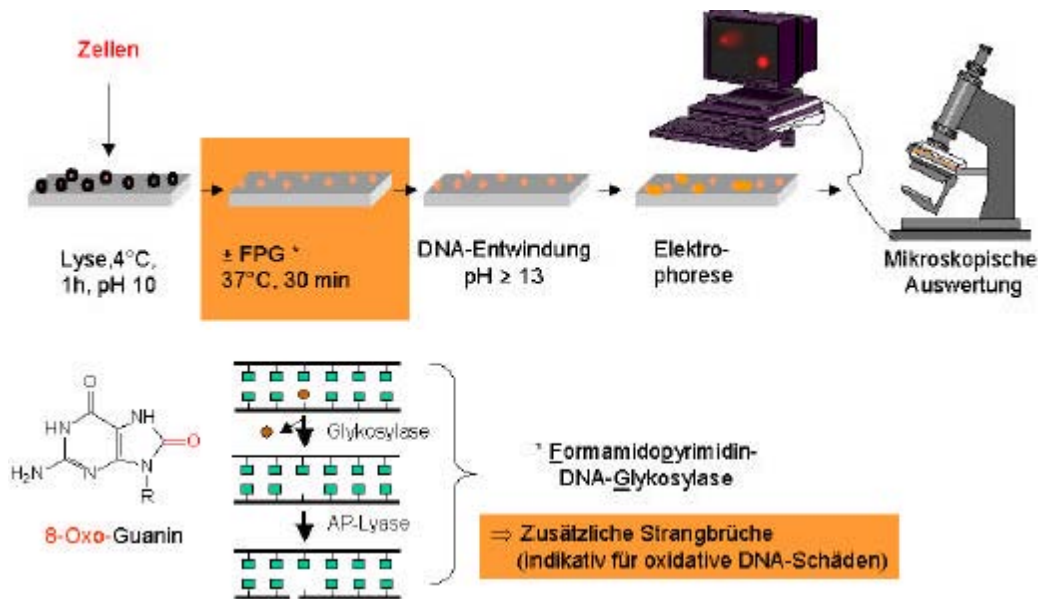
**Abbildung 3-27: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung).**

An einem Fluoreszenzmikroskop werden die Zellkerne mit Hilfe einer Digitalkamera Computergestützt ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln (s. Abbildung 3-28) und dem Test seinen Namen gaben. Als Maß für die DNA Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI%) verwendet.



**Abbildung 3-28: Beispiele für Kometen mit unterschiedlichem Schädigungsausmaß unter dem Fluoreszenzmikroskop.**

Neben der oben beschriebenen Methode können durch Variation des pH-Wertes weitere Informationen über die Art der Strangbrüche erhalten werden [Horvathova *et al.*, 2001]. Bei einer DNA-Denaturierung unter neutralen Bedingungen werden nur DNA Doppelstrangbrüche (DSB) erfasst. Im alkalischen Milieu dagegen, bei den die DNA in Einzelsträngen vorliegt, werden neben DSB ab einem pH-Wert von 12,1 auch Einzelstrangbrüche (SSB) und ab einem pH  $\geq 13$  so genannte alkali-labile Stellen detektiert [Fairbairn *et al.*, 1995]. Der Comet Assay wird mittlerweile überwiegend im alkalischen Milieu (pH  $\geq 13$ ) durchgeführt [Fairbairn *et al.*, 1995; Kassie *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1988]. Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, ist es möglich, die Zellkerne in den Agarosegelen mit Reparaturenzymen wie Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) oder Endonuklease III zu behandeln. Durch die DNA-Glykosylaseaktivität werden oxidierte Basen (v.a. 8-OxoG durch FPG) sowie deren ringgeöffnete Imidazole herausgeschnitten, wobei eine Lücke verbleibt. Durch die AP-Lyaseaktivität kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert [Laval, 1996] und zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt (Abbildung 3-29). Die Differenz aus Strangbrüchen mit und ohne Enzymbehandlung wird als spezifisch oxidative DNA-Schäden interpretiert [Collins, 2000].



**Abbildung 3-29:** Durchführung des Comet Assays zur Detektion von Gesamtschäden (schematische Darstellung).

### 3.7.4 Bestimmung des ROS-Level (DCF-Assay)

Beim Dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay) handelt es sich um einen photometrisch kinetischen Assay, der aufgrund eines relativen Fluoreszenzanstiegs durch Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA, Abb. 3-30) die Bestimmung des ROS-Levels in der Zelle ermöglicht. Entwickelt wurde diese Methode von Keston und Brandt zur Detektion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase in einem zellfreien System [Keston and Brandt, 1965]. Die Messung intrazellulärer ROS in lebenden Zellen erfolgte im DCF-Assay erstmals durch [Bass *et al.*, 1983]. Seitdem wurde diese Methode häufig eingesetzt, um intrazelluläre ROS mittels Fluoreszenz-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie sowie in neueren Arbeiten fluorimetrisch (Plattenphotometer) [Wang and Joseph, 1999b] zu detektieren. Auch wenn die Spezifität des Tests nicht geklärt ist [Frank *et al.*, 2000], ist dieser Assay eine Screening-Methode, die in Verbindung mit anderen Markern eine Aussage über das Ausmaß oxidativer Zellschädigung und deren Modulation durch Antioxidantien zulässt.

### Prinzip der Methode

Der unpolare, nicht fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) diffundiert durch die Zellmembran ins Innere der Zelle und wird dort durch intrazelluläre Esterasen zu der nicht fluoreszierenden Substanz Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert. DCFH wird durch ROS zu dem fluoreszierenden Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Abbildung 3-30). Aufgrund seiner höheren Polarität kann der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren und verbleibt in der Zelle. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen [LeBel *et al.*, 1992].

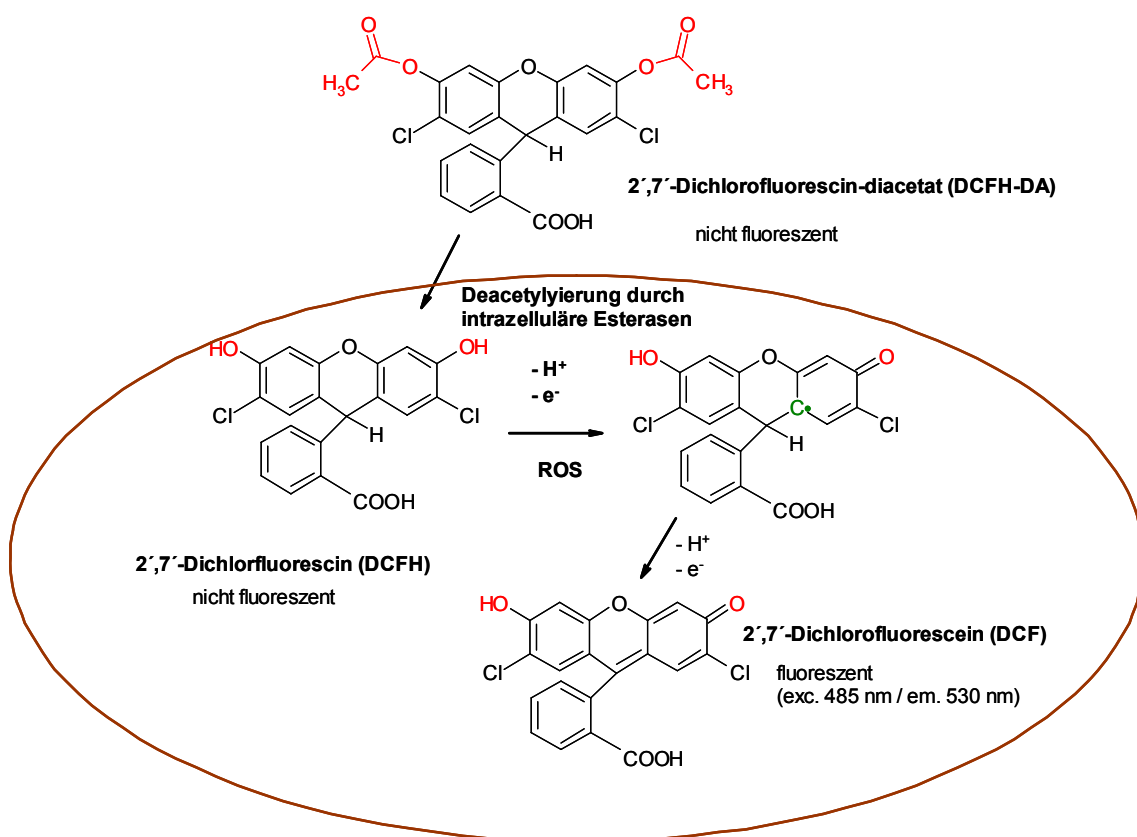


Abbildung 3-30: Reaktionen von DCFH zur fluoreszierenden Form DCF, nach [LeBel *et al.*, 1992]

Die Vermutung, dass die im DCF-Assay ermittelte Fluoreszenz direkt proportional zur Konzentration von Wasserstoffperoxid ist, wurde in den letzten Jahren mehrfach widerlegt. Der Farbstoff reagiert nicht spezifisch mit einer bestimmten reaktiven Sauerstoffspezies, vielmehr stellt er einen Detektor für eine Reihe oxidierender Reaktionen dar [Hempel *et al.*, 1999]. Im Gegensatz zum Hydroxylradikal [Myhre *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 1994] kann Wasserstoffperoxid alleine DCFH nicht direkt zu DCF

oxidieren; dazu ist die Anwesenheit von Peroxidase [Halliwell and Gutteridge, 1999; Myhre *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 1999] oder Eisenionen [Crow, 1997] notwendig.

Der DCF-Assay bietet also die Möglichkeit, den Redoxstatus der Zelle zu erfassen und die Modulation von ROS unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen [Wang and Joseph, 1999b]. Er lässt jedoch keine Aussage zu, welche ROS im Testsystem vorliegen.

### 3.7.5 Glutathionbestimmung (photometrischer Assay)

Der Glutathiongehalt wurde im Rahmen dieser Arbeit in Vollblut mit einem Verfahren bestimmt, das sich an die Bestimmung von Akerboom und Sies anlehnt und von Gallagher *et al.* modifiziert wurde [Akerboom and Sies, 1981; Gallagher *et al.*, 1994b]. Bei diesem Verfahren wird der Gesamtglutathiongehalt über einen kinetischen Test bestimmt, in dem GSH, GSSG und Glutathionreduktase (GSR) kontinuierlich in einer NADPH-abhängigen Reaktion 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zum chromophoren 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB) reduzieren (Abbildung 3-31).

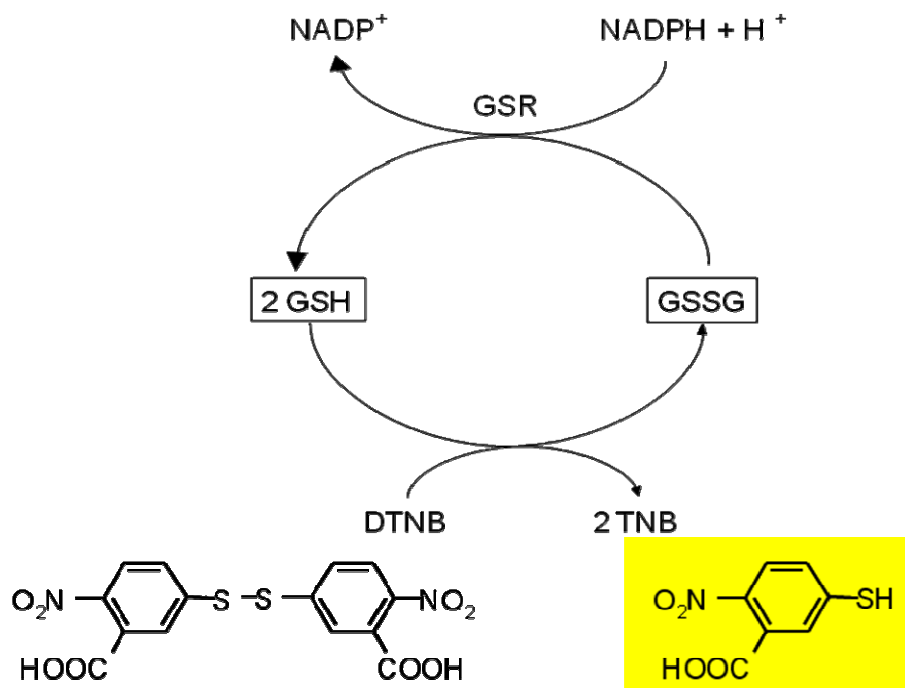


Abbildung 3-31: Schematische Darstellung der Reaktion von GSH mit DTNB.

Die Bildung von TNB kann über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, ist proportional zur tGSH-Konzentration, da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind. Die Berechnung der tGSH Konzentration erfolgt durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen. Zur Messung von GSSG wird GSH mit dem Nukleophil 2-Vinylpyridin kovalent gebunden (Abbildung 3-32) und anschließend die oben beschriebene Messung durchgeführt. Durch Differenzbildung werden der GSH Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet.

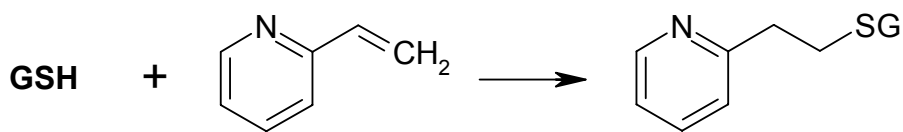


Abbildung 3-32: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin.

### 3.7.6 Proteinexpression (Western Blot)

Die Expression ARE-abhängiger Enzyme wurde über Western Blot nach Standardmethodik untersucht [Luttmann *et al.*, 2006; Towbin *et al.*, 1979]. Es handelt sich dabei um eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Die Proteine können auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert und über Chemolumineszenz detektiert werden.

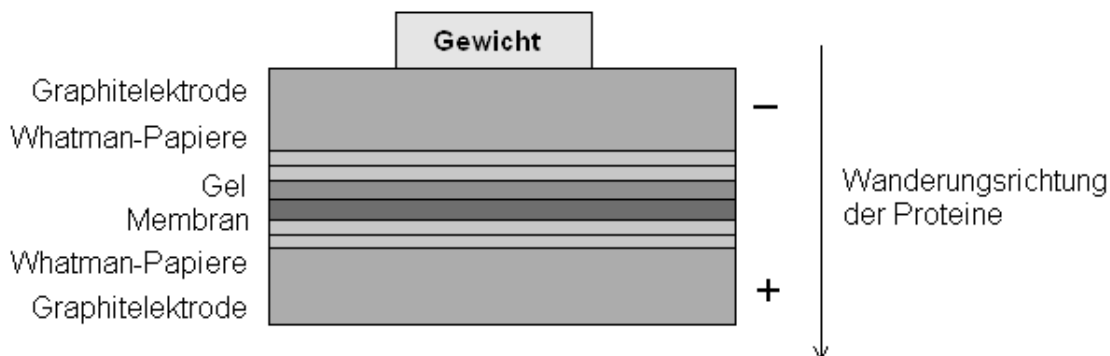
Ein Western Blot Experiment lässt sich in drei grundlegende Arbeitsschritte einteilen:

- Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese
- Transfer der Proteine auf eine Membran (eigentlicher Blot)
- Detektion des untersuchten Proteins

Die Ladung eines Proteins ist abhängig von seiner Aminosäuresequenz und dem pH-Wert. Um konstante Bedingungen für die Auftrennung eines Proteingemisches zu schaffen und Unterschiede in der Ladungsdichte der Proteine auszugleichen, erfolgt die Auftrennung mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Vertikalsystem (Mini-Protean Tetra Cell, 150 V) unter denaturierenden Bedingungen. Das amphiphile Natriumdodecylsulfat (SDS) bildet mit den Proteinen einen Komplex mit negativer Oberflächenladung. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und ein

konstantes Masse-/Ladungsverhältnis erreicht. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht und eine spätere Zuordnung der Proteinbanden im Western Blot. Bei der diskontinuierlichen Variante SDS-PAGE passieren die Proteine zuerst ein Sammelgel (4%). In diesem werden sie zu einer scharfen Bande fokussiert, bevor sie in das eigentliche Trenngel (12%) einwandern. Auf diese Weise kommt es zu einer guten Auftrennung und hohen Schärfe der Proteinbanden [Lottspeich, 1998; Luttmann *et al.*, 2006]

Nach der elektrophoretischen Trennung erfolgt Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Semi-Dry-Blotting unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (90min, 50mA pro Gel) (Abbildung 3-33). Im Anschluss an den Proteintransfer wird die Membran in „Blockingreagenz“ (5% Milchlösung, 1h bei RT) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstelle abzudecken. Die Visualisierung der Proteine geschieht über Immunodetektion. Nach der Inkubation der Membran mit dem Primär-Antikörper folgt eine Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper, der den Primärantikörper spezifisch erkennt. [Albrecht, 1990; Luttmann *et al.*, 2006].



**Abbildung 3-33: Aufbau des Western Blots**

Die Detektion der Proteinbanden erfolgt mittels einer Meerrettichperoxidase-vermittelten Chemilumineszenz unter Verwendung des „horseradish peroxidase“ (HRP) Western Blot Detektions System (LumiGlo). Die Meerrettichperoxidase ist an den Sekundärantikörper gekoppelt. Sie katalysiert die Reaktion zwischen den beiden Komponenten Luminol und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) der LumiGlo-Reagenzlösung. Bei der Reaktion wird aus Luminol und  $H_2O_2$  angeregtes 3-Aminophthalat gebildet, das unter Aussendung von Licht in den energetischen Grundzustand zurückfällt (Abbildung 3-34) [Albrecht, 1990]. Nach Ablauf der Reaktion wird die

Chemilumineszenz mithilfe des Lumi-Imagers detektiert [Albrecht, 1990; Luttmann *et al.*, 2006].

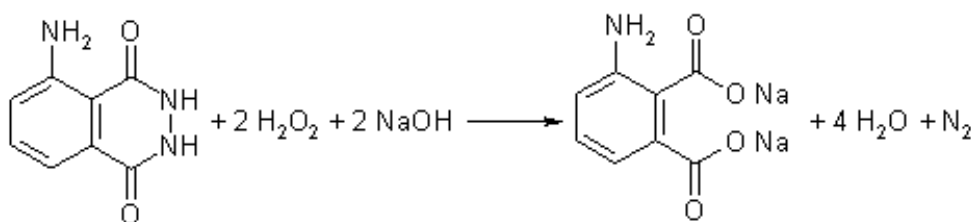


Abbildung 3-34: Chemolumineszenz-Reaktion [Albrecht, 1990]

### 3.7.7 Bestimmung der direkten antioxidativen Aktivität (photometrischer Assay)

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antioxidantien gibt es eine Reihe von Tests, die es ermöglichen, Aussagen über die Effektivität der einzelnen antioxidativ wirksamen Substanzen zu machen. Die Chemie dieser Assays beruht auf zwei unterschiedlichen Reaktionsmechanismen: Wasserstoff-Atom-Transfer (HAT) oder Ein Elektronentransfer (SET) [Prior *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwei unterschiedliche Testsysteme verwendet TEAC und ORAC.

Diese zellfreien Tests basieren auf der Generierung eines meist farbigen, stabilen, langlebigen Radikals, welches im Verlauf des Assays abgefangen oder durch Anwesenheit des Antioxidans verzögert gebildet wird.

#### 3.7.7.1 Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC (SET)

Der TEAC-Test (Trolox equivalent antioxidative capacity) [Miller *et al.*, 1993; Re *et al.*, 1999] wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Er beruht auf der Generierung des stabilen ABTS-Radikals (Abbildung 3-35) durch die Oxidation von 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat):

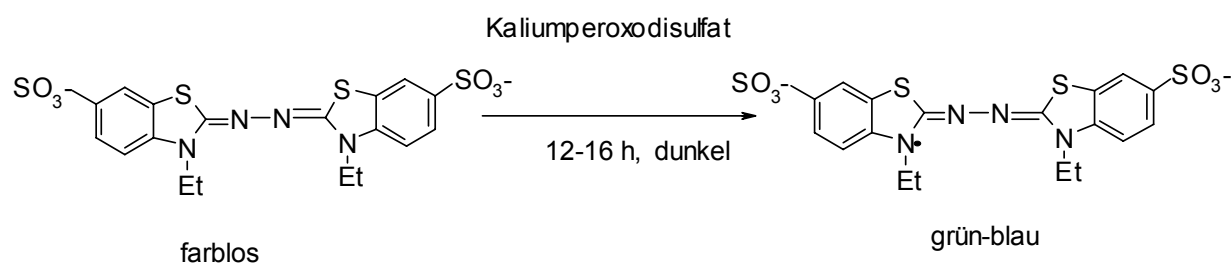


Abbildung 3-35: Oxidation von ABTS.



Die Generierung dieses langlebigen Radikals kann auf zwei Wegen erfolgen. ABTS kann mit Metmyoglobin in einer Pufferlösung gemischt werden, zum Starten der Reaktion wird anschließend  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugegeben [Miller *et al.*, 1993]. Alternativ kann ABTS zusammen mit Kaliumperoxodisulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) in Wasser gelöst werden [Re *et al.*, 1999].

Das ABTS<sup>•+</sup>-Kation hat drei Absorptionsbanden mit Maxima bei 645, 734 und 815 nm. Zur Bestimmung des TEAC-Wertes wird dieses zum Antioxidans gegeben. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Fähigkeit einer Substanz zum Abfangen des Radikals beobachtet wird. Bei früheren Tests wurde ein langlebiges Radikal erst in Gegenwart der Antioxidantien generiert. Dies kann zu einer Überschätzung der antioxidativen Kapazität der jeweiligen Substanzen führen, da bei diesen Assays zusätzlich die Inhibition der Radikalbildungsreaktion erfasst wird. So kommt es dazu, dass auch bei Substanzen, die eigentlich nicht in der Lage sind, Radikale abzufangen, eine antioxidative Kapazität festgestellt wurde (z.B. KCN) [van den Berg *et al.*, 1999].

Beim TEAC-Test wird Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon, als Vergleichssubstanz verwendet. Der TEAC-Wert gibt an, welche Konzentration Trolox [mM] nötig ist, um dieselbe Wirksamkeit zu erreichen wie eine Lösung der Konzentration 1 mM (Reinsubstanzen) oder 1 mg/ml (Mischungen) der untersuchten Probe [Pellegrini *et al.*, 1998].

Während des Messzeitraums von 6 min. finden sowohl schnelle als auch langsame Radikalabfangreaktionen statt. Zur Standardisierung wurde ein einheitlicher Zeitpunkt gewählt, um die einzelnen Antioxidantien miteinander vergleichen zu können. [Re *et al.*, 1999]

### 3.7.7.2 Oxygen radical absorbing capacity, ORAC (HAT)

Ein weiterer Test zur Bestimmung der zellfreien antioxidativen Eigenschaften von Substanzen und Lösungen, der in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist der ORAC-Assay. Er wurde erstmals 1993 von Cao *et al.* vorgestellt und von Ou *et al.* optimiert [Cao *et al.*, 1993; Ou *et al.*, 2001]. Das Verfahren basiert auf der Zerstörung eines Fluorophors durch kontinuierlich generierte Peroxylradikale und einer dadurch abnehmenden Fluoreszenzintensität. Durch in der Probe vorhandene Antioxidantien wird diese Abnahme zeitlich verzögert, wobei die Dauer der Verzögerung von der Menge an Antioxidantien in der Probe abhängt. Am häufigsten verwendet werden die Fluorophore  $\beta$ -Phycoerythrin und Fluorescein, wobei letzteres photostabil ist. Da

Fluoreszein gegenüber  $\beta$ -Phycoerythrin Vorteile aufweist, wurde die Methode nach Ou *et al.* für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die Generierung der Radikale erfolgt durch 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin)-dihydrochlorid (AAPH), welches in wässriger Lösung konstant Peroxylradikale generiert (Abbildung 3-36).

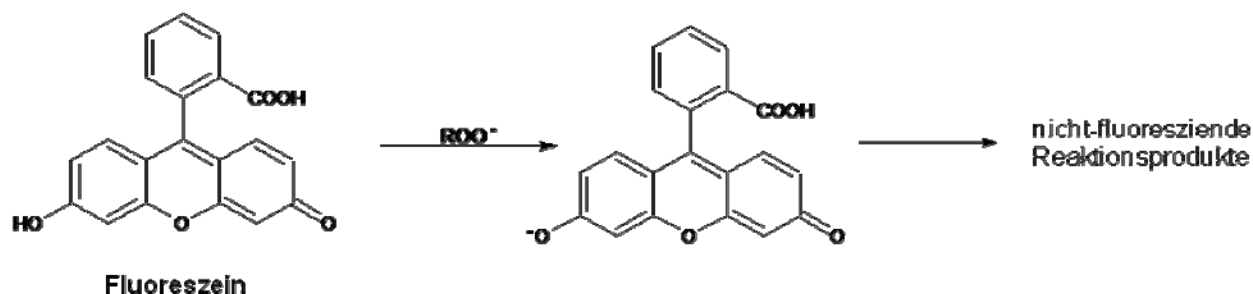


Abbildung 3-36: Inaktivierung der Peroxylradikale durch Fluorescein, modifiziert nach [Ou *et al.*, 2001]

Das bei der Reaktion von Fluorescein mit  $ROO^\bullet$  entstehende Fluoreszeinradikal reagiert weiter und bildet am Ende ein nicht fluoreszierendes Produkt, was zu einem Abfallen der Fluoreszenzintensität der Probe führt. Die Zugabe von Antioxidanzien führt zu einer kompetitiven Reaktion mit Fluorescein um die Inaktivierung der Radikale. Die Abnahme der Fluoreszenz wird zeitlich herausgezögert (lag time), da zunächst das Antioxidans „aufgebraucht“ wird [Prior *et al.*, 2005].

Zur Berechnung der antioxidativen Wirksamkeit werden die Integrale der Messkurven (area under curve, AUC) verwendet.

### 3.7.8 Quantitative Bestimmung der Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )-Konzentration (FOX1-Assay)

Polyphenole bilden im Zellkulturmedium unter bestimmten Voraussetzungen Wasserstoffperoxid, das wiederum die Wirkung der untersuchten Substanz beeinträchtigen kann. Um einen solchen Effekt berücksichtigen zu können wurde unter den Bedingungen der Zell-Inkubation auf die Generierung von Wasserstoffperoxid durch Kaffeeinhaltsstoffe/-extrakte geprüft. Der dazu verwendete FOX-Assay (ferrous oxidation in xylene orange, Abbildung 3-37) stellt eine einfache, indirekte photometrische Nachweismethode für verschiedene Peroxide dar.

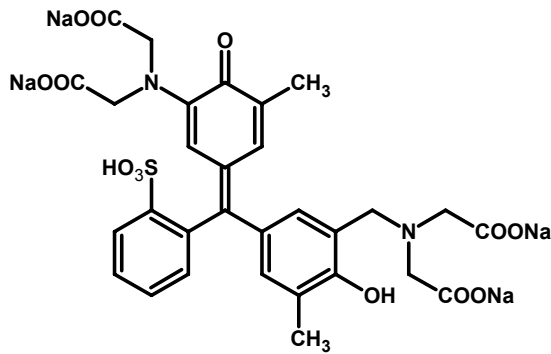
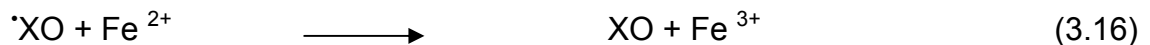


Abbildung 3-37: Xylenolorange

Ursprünglich wurde die FOX-Methode 1973 von Gupta zur Quantifizierung von Wasserstoffperoxid beschrieben [Gupta, 1973]. Das Verfahren wurde von Wolff *et al.* zur Messung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im wässrigen Milieu (FOX1- Methode) durch Zusatz von Sorbitol modifiziert [Wolff, 1994].

Das Prinzip der Methode basiert auf einer Reaktion der Peroxide wobei Peroxylradikale entstehen, die zur Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  im sauren Milieu führen (Gln. 3.14;-3.17;). Die  $\text{Fe}^{3+}$ -Kationen bilden dabei mit dem in der Lösung vorhandenen Farbstoff Xylenolorange (3,3'-bis[2,2'-bis(carboxymethyl)aminoethoxy]-o-cresosulfonephthalein) einen intensiv gefärbten, rot-blauen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 560nm [Banerjee *et al.*, 2003; Liu and Sun, 2003; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994; Wolff, 1994].



Durch Zusatz von Sorbitol kann die Ausbeute an  $\text{Fe}^{3+}$  pro  $\text{H}_2\text{O}_2$  gesteigert werden, was zu einer Erhöhung des molaren Extinktionskoeffizienten und damit einhergehend der Empfindlichkeit des Assays führt [Wolff, 1994].

### 3.7.9 Erfassung von Körpergewicht /-größe und Körperzusammensetzung

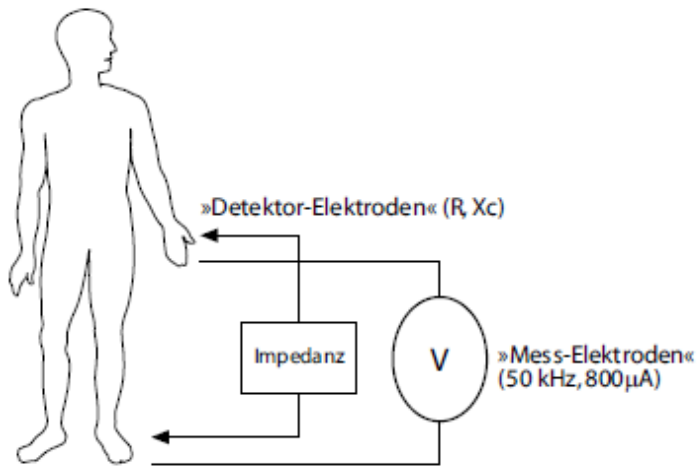
Das Körpergewicht der Probanden wurde mit einer medizinischen Personenwaage (Seca delta 707) und die Körpergröße mit einem Seca 206-Rollmessband erfasst. Die beiden Messparameter dienen zur Berechnung von Body-Maß-Index (BMI, Gl. 3.18). Dazu wird der Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern gebildet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{\text{Körpergröße [m}^2\text{]}} \quad 3.18$$

Bei männlichen Mitteleuropäern liegen die Normwerte für den BMI zwischen 20 und  $25 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ . Die Werte bis  $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$  deuten auf Übergewicht hin und  $\text{BMI} > 30$  spricht man von Fettsucht (Adipositas).

Die Körperzusammensetzung lebender Organismen kann nicht direkt gemessen werden. Die Bestimmung von Kompartimenten des Körpers ist nur näherungsweise mit indirekten Messmethoden, wie z.B. der bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) möglich. Es existieren vier verschiedene Körperkompartimentmodelle, die bei der BIA herangezogen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde das 2-Kompartiment-Modell verwendet, welches unterscheidet zwischen in Körperfett und fettfreie Masse (Magermasse). Bei Messungen in diesem Modell wird ein Kompartiment direkt bestimmt und das andere als Differenz zum Körpergewicht berechnet [Stein, 2003] [Tomczak, 2003]. Die Bioimpedanz basiert auf der unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeit von Körperkompartimenten und wird mit Hilfe eines Wechselstroms (50Khz) gemessen. Bei dieser Frequenz gibt es in menschlichen Körpern ein Maximum in der Phasenverschiebung zwischen dem ohmschen Widerstandanteil auch **Resistanz** (Ohmscher Widerstand, R) genannt und dem kapazitiven Anteil der auch **Reaktanz** (Blindwiderstand, Xc) bezeichnet wird. Die Resistanz resultiert aus dem elektrischen Widerstand des fettfreien Gewebes und dem Wassergehalt (intra-, extrazelluläre Flüssigkeit). Die Reaktanz ergibt sich aus dem elektrischen Widerstand der stoffwechselaktiven Zellen (Kondensatorwirkung der Zellmembranen) [Kushner *et al.*, 1990; Kyle *et al.*, 2004a; Kyle *et al.*, 2004b; Piccoli *et al.*, 1994].

Die Körperzusammensetzung wurde in der Studie mit einem Maltron-Bioimpedanz-Analysegerät BF-906 ermittelt. Bei der Messung der Impedanz geht man davon aus, dass sich der menschliche Körper wie ein homogener zylindrischer Widerstand verhält (Abbildung 3-38). Über zwei Stromeingabeelektroden, die an Hand und Fußrücken angeklebt werden, wird bei konstanter Stromstärke ein homogenes elektrisches Feld im Körper der Messperson erzeugt.



**Abbildung 3-38: Bioimpedanzmessung**

Zwischen den beiden Elektroden kommt es zu einem Spannungsabfall, welcher über zwei sensible Messelektroden an Hand und Fuß registriert wird. Da die elektrische Leitfähigkeit im Körperwasser hoch ist, resultiert daraus ein niedriger Spannungsabfall in der flüssigkeitsreichen fettfreien Masse. Umgekehrt erfolgt im Fettgewebe und in den Knochen eine große Abnahme der Stromspannung aufgrund ihrer niedrigen Leitfähigkeit.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Materialien

##### Geräte

Brutschrank:	Heraeus Cytoperm BBD 6220 WTC (Binder)
Sterilbank:	Heraeus Instruments Herasafe HS 12 Heraeus Instruments Laminair HLB 2472 BS
Mikroskop:	Auflicht, Zeiss
Zentrifugen:	Heraeus Instruments Biofuge fresco Sigma 3-1
Biofreezer:	Herafreeze (Heraeus)
Multipette:	(Eppendorf, Abimed)
Pipettierhilfe:	Pipettus-Akku (Technomara)
Ultraschallbad:	SONOREX RK 100 (Bandelin)
Wasserbad:	Julabo SW-20C

##### Chemikalien/Nährlösungen

Medium:	- Caco-2: Dulbecco's MEM/Nutrient-Mix F12 (DNM) (Gibco) - HT-29, primäre Kolonzellen: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
Zusätze:	- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco/Invitrogen: 10.000 units/ml Penicillin G Natrium; 10.000 units/ml Streptomycin-sulfat) - 25-100 ml Fetales Kälberserum (FKS) (Gibco, Invitrogen)
Viabilität:	- Trypanblaulösung: (Sigma), mit Zellsuspension 1:1 verdünnen - Neubauer-Zählkammer
	- Trypsin, 3,5 U/mg (Serva)
	- EDTA, NaCl, KCl, NaOH, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Methanol, jeweils p.A.-Qualität (Merck)
	- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , p.A. (Riedel-de-Häen)
	- Ethanol, p.A., HEPES (Roth)
	- DMSO für die UV-Spektroskopie (Fluka)
	- $\text{NaHCO}_3$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Glukose (Merck)
	- PBS (Stammlösung 10x): - 90 g NaCl

- 7,26 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

- 2,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

mit bidest. Wasser auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4

vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril autoklavieren

- Trypsin/EDTA:

- 125 mg Trypsin (3,5 U/mg, Serva)

- 65,5 mg EDTA

auf 250 ml mit PBS auffüllen, kalt rühren lassen, pH =7,2

### **Verbrauchsmaterialien**

- Gewebekulturflaschen, Kryoröhrchen steril, PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml steril, 1,5 bzw.

2,2 ml Reaktionsgefäße, Gewebekulturschalen 94/16 mm, 60/15 mm, steril Wellplatten (96, 24), Pipettenspitzen (Greiner, Sarstedt)

- Sterilfilter 0,2  $\mu\text{m}$ , (Sartorius)

- Spritzen, Kanülen (Braun)

### **4.1.2 Kultivierung**

Das Arbeiten mit Zellkulturen erforderte sterile Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen als Monolayer im Brutschrank bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit.

#### *4.1.2.1 Mediumwechsel*

Ziel der Zellkultur ist es, den Zellen möglichst gute Wachstumsbedingungen zu bieten und die Vitalität zu erhalten. Im Laufe der Kultivierung entstehen einerseits saure Ausscheidungsprodukte der Zellen sowie Zerfallsprodukte des Mediums, die das Wachstum der Zellen beeinträchtigen können.

Spätestens nach Farbumschlag des Mediums (Phenolrotindikator) von rot nach gelb wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Stoffwechselprodukte zu eliminieren. Dazu wurde das Medium abgegossen und die Zellen einmal mit PBS-Lösung gespült. Anschließend kultivierte man mit ca. 50 ml Kulturmedium. [Lindl, 2000]

#### *4.1.2.2 Subkultivierung*

Wenn Zellen zu dicht wachsen, verändert sich ihr Stoffwechsel. Einzelne Zellen sterben ab oder hören auf, sich zu teilen (Kontaktinhibition). Ist der Boden der

Kulturflasche mit Zellen konfluent bewachsen oder das Kulturmedium mit Suspensionszellen dicht besiedelt, war es notwendig, die Zellen zu subkultivieren (=Passagieren). Die Passagehäufigkeit hängt dabei von der Generationszeit der jeweiligen Zelllinie ab. Für die in dieser Arbeit verwendeten Caco-2 Zellen beträgt die Verdopplungszeit ca. 80 h, für HT-29 Zellen 40-60 h. Für eine Passage wurde das Medium abgegossen und die Zellen zwei- bis dreimal mit PBS-Lösung gespült, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden mit ca. 2 ml Trypsinlösung bei 37°C bis zum beginnenden Ablösen inkubiert und dann durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden gelöst. Durch Zugabe von 5 ml FKS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert, da eine zu lange Behandlung mit dem Verdauungsenzym ein Absterben der Zellen zur Folge hat. Die Zellsuspension wurde anschließend durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette gut durchmischt und die Zellen dadurch vereinzelt. Anschließend streute man in eine neue Flasche je nach Bedarf eine entsprechende Anzahl von Zellen aus und kultivierte mit 50 ml frischem Kulturmedium.

### *4.1.2.3 Einfrieren von Zellen*

Da die Lebenszeit von Zellen im Tiefkühlschrank bei -80°C bzw. im flüssigen Stickstoff begrenzt ist, sollte der Vorrat an Zellen regelmäßig erneuert werden, d.h. eingefrorene Zellen in Kultur bringen und mit wenigen Passagen wieder einfrieren. Eine konfluent gewachsene Kulturflasche wurde mit minimaler Menge Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und mit möglichst wenig Medium abgestoppt, um die Zellsuspension konzentriert zu halten. Eine entsprechende Anzahl an Kryotubes wurde mit 150 µl FKS und 150 µl DMSO und 1.200 µl Zellsuspension gefüllt. Die Zellzahl sollte ungefähr eine Million pro Kryoröhrchen betragen. Die Zugabe von DMSO war trotz seiner Zytotoxizität unerlässlich, da es die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert [Lindl, 2000].

Zunächst wurden sie bei -20°C, am folgenden Tag bei -80°C eingelagert. Zur längerfristigen Lagerung ist flüssiger Stickstoff günstiger.

### *4.1.2.4 Auftauen von Zellen*

Um die Zellen in Kultur zu bringen, mussten die Zellen aus dem Tiefkühlschrank aufgetaut werden. Dies sollte möglichst schnell passieren, um die toxische Wirkung des zugesetzten DMSO gering zu halten. Deshalb wurden die Kryoröhrchen bei 37°C



angetaut und sobald sich die Suspension vom Rand löst in ein PP-Röhrchen mit 10-12 ml vorgewärmtem Medium gegeben und dann abzentrifugiert (1.500 Upm, 3 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit etwas Medium wieder aufgenommen. Das Einsäen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup>- Kulturflaschen. Am nächsten Tag sollte unbedingt ein Mediumwechsel erfolgen, damit die toten und stark geschädigten Zellen entfernt wurden und das Wachstum der lebenden Zellen nicht beeinträchtigt wird [Lindl, 2000].

## **4.2 Zellinkubation**

### **4.2.1 Materialien**

- Chlorogensäure , Kaffeesäure, Catechol, 1,2,4-Trihydroxibenzol, Trigonellin-Hydrochlorid, N-Methylpyridinium-Iodid, N-Metyl-2-Methylpyridinium-Iodid, N-Methyl-3-Methylpyridinium-Iodid (AG Hofmann)
- Quercetin-Dihydrat, > 99% ,
- Menadion (>97% HPLC), TBH (70% in Wasser), (Riedel-de Haen)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) für die UV-Spektroskopie (Fluka)
- Katalase (Catalase, From Bovine Liver, Sigma)

Für die Oxidansinkubation wurde serumfreies Medium (= S-Med), bei den Antioxidans-Inkubationen wurde, soweit nicht anders angegeben, ein um die Hälfte FKS reduziertes Medium (= Inkubationsmedium, „I-Med“) verwendet. In einigen Inkubationen mit den Prüfsubstanzen / Extrakten wurde 100 U/ml Katalase zugesetzt, um im Inkubationsmedium gebildetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abzubauen (s. 3.7.3). Für die Versuche wurden Zellpassagen zwischen 20 und 48 herangezogen. Der Lösungsmittelanteil (DMSO, Bidest. Wasser) betrug in Monolayerkultur 0,1% (v/v).

### **4.2.2 Substanzen**

#### **Reinsubstanzen**

Die Stammlösung war 100 mM, in Einzelfällen 300 mM in DMSO. Daraus wurden, ebenfalls in DMSO, Verdünnungen hergestellt, so dass Lösungen von 30, 10, 3, und 1 mM entstanden. In einzelnen Versuchen wurden entsprechende kleinere

Stammlösungen/Verdünnungen hergestellt. Da Trigonellin in DMSO unlöslich ist, wurde Stammlösung (100 mM) mit bidest. Wasser hergestellt.

### **Kaffeeextrakte**

Die Kaffeeextrakte wurden in bidest. Wasser gelöst, wobei die Stammlösung 250 mg/ml betrug. Diese wurden jeweils verdünnt zu 100, 50, 10, 5, und 1 mg/ml, in einzelnen Versuchen entsprechend weiter.

### **Menadion**

Die Konzentration der Stammlösung betrug 15 bzw. 6 mM bei Endkonzentrationen 15  $\mu$ M bzw. 6  $\mu$ M (0,1% DMSO) im Medium.

### **4.2.3 Zellinkubationen für den Comet Assay, Western Blot und DCF-Assay**

Für Comet Assay wurde  $1 \cdot 10^5$  HT-29 Zellen und  $2,5 \cdot 10^5$  Caco-2 Zellen und für Western Blot Assay  $1,5 \cdot 10^6$  HT-29 Zellen verwendet. Für DCF-Assay wurde  $3,2 \cdot 10^4$  HT-29 Zellen in 96-Lochplatten eingesetzt.

Bei dem zweistufigen Inkubationsprotokoll mit Kaffeeinhaltsstoffe bzw. Kaffeeextrakte in Anlehnung an die Versuche von Aherne und O'Brien wurden die Zellen in Petrischalen bzw. 96-Lochplatten ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. [Aherne and O'Brien, 2000].

1. Stufe: Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde das Inkubationsmedium mit /ohne Katalase (100 U/ml) und den Testsubstanzen in gewünschter Konzentration dazugegeben und entsprechende Zeit im Brutschrank inkubiert.

2. Stufe: Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen, um Reste der Testsubstanzen aus Stufe 1 zu entfernen. Nun wurde das serumfreie Medium bzw. PBS mit den enthaltenen Oxidantien zugegeben und im Brutschrank inkubiert. [Aherne and O'Brien, 1999, 2000]

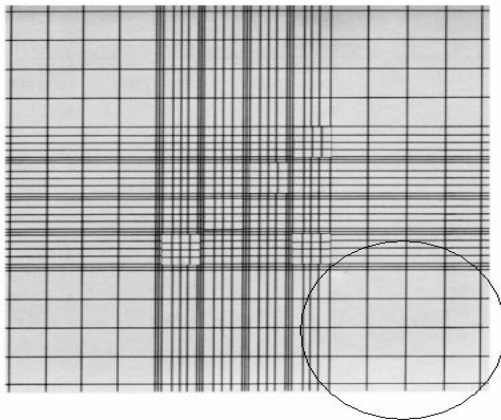
Danach wurden die Caco-2-Zellen für den Comet Assay mit 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert und nach zwei bis drei Minuten mit gleicher Menge N-Medium abgestoppt. Danach wurden mit zweimal 500  $\mu$ l S-Med die verbliebenen Caco-2-Zellen abgeschabt und wiederum in das Gefäß überführt. Nach Mischen wurde 25  $\mu$ l für die Viabilität entnommen und der Rest wurde entsprechend weiter aufgearbeitet

(s.4.5). Die inkubierten HT-29 Zellen für den DCF-Assay und Western Blot Assay wurden nach Anleitung (s. 4.6; 4.9) durchgeführt.

### **4.3 Viabilitätsbestimmung**

#### **4.3.1 Zellzahlbestimmung**

Die Anzahl der Zellen wird mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abbildung 4-1). Diese besteht aus neun großen Quadraten. Jedes dieser Quadrate hat eine Fläche von  $1\text{ mm}^2$ , dies ergibt bei einer Tiefe der Kammer von  $0,1\text{ mm}$  ein Volumen von  $0,1\text{ }\mu\text{L}$ . Für die direkte Zellzählung wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop kann anschließend die Zellzahl pro  $0,1\text{ }\mu\text{L}$  bestimmt werden [Lindl, 2000].



**Abbildung 4-1: Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2000]**

#### **4.3.2 Bestimmung der Viabilität**

Mittels Trypanblauausschluss-Test können lebende von toten Zellen unterschieden und so die Lebendzellzahl bzw. Viabilität bestimmt werden. Hierfür wurden in einem Mikroreaktionsgefäß ein Aliquot Zellsuspension mit einem Aliquot Trypanblau gemischt und in die Zählkammer gebracht. Aufgrund der permeablen Membran von geschädigten Zellen lagert sich der Farbstoff in diese ein, sie erscheinen blau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend. Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der intakten, viablen Zellen zur Gesamtzellzahl und wird in

% angegeben. Die relative Lebendzellzahl ergibt sich aus dem Verhältnis der Zellzahl viabler Zellen der Probe zu derjenigen der Kontrolle.

## **4.4 Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben**

### **4.4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Sterilbank:	Heraeus Instruments Herasafe HS 12 Heraeus Instruments Laminair HLB 2472 BS
Mikroskop:	Auflicht, Zeiss
Zentrifugen:	Heraeus Instruments Biofuge fresco Sigma 31
Biofreezer:	Herafreeze (Heraeus)
Multipette:	(Eppendorf, Abimed)
Pipettierhilfe:	Pipettus-Akku (Technomara)
Wasserbad:	Julabo SW-20C
Kryoröhrchen steril, PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml steril, 1,5 bzw. 2,2 ml	
Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen (Greiner, Sarstedt)	
- Sterilfilter 0,2 µm, (Sartorius)	
- Spritzen, Kanülen (Braun)	
- EDTA-Monovetten (Sarstedt)	

### **Chemikalien**

- EDTA, NaCl, KCl, NaOH, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Methanol, jeweils p.A.-Qualität (Merck)	
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , p.A. (Riedel-de-Häen)	
- Ethanol, p.A., HEPES (Roth)	
- DMSO für die UV-Spektroskopie (Fluka)	
- $\text{NaHCO}_3$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Glukose (Merck)	
- Histopaque® -1077 (Sigma-Aldrich)	
- 0,9 % Natriumchloridlösung	90 g NaCl in 1 L aqua bidest.
- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA)	10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest. Lagerung bei 4°C
- PBS (Stammlösung 10x):	- 90 g NaCl - 7,26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - 2,1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$

mit aqua bidest. auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4  
vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril autoklavieren

### 4.4.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch einen Arzt des Westpfalzkrankenhauses Kaiserslautern und wurde in jeder Studienphase (Beginn und Ende) Dienstagmorgens ab 10 Uhr durchgeführt. Den Probanden wurde im Sitzen nach proximaler Stauung und Palpation der Armvene, sowie Desinfektion der Einstichstelle, über eine Multifly-Kanüle 30 ml Blut in EDTA-Monovetten abgenommen.

### 4.4.3 Vollblut

Für den Comet Assay wurden aus den EDTA-Monovetten 100 µl Blut in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Aufarbeitung (s. 4.5) auf Eis gelagert. Für die Bestimmung von GSH und GSSG (s. 4.7) wurden in Kryoröhrchen 0,4 ml 10% SSA zur Proteinfällung vorgelegt und bis zur Blutentnahme bei 4°C gekühlt. Pro Probe wurden 100 µl frisch entnommenes Blut in jedes vorbereitete Kryoröhrchen gegeben, kurz vermischt und sofort bis zur Bestimmung in flüssigem Stickstoff gelagert [Aherne and O'Brien, 2000].

### 4.4.4 Plasmagewinnung

Für die Gewinnung von Plasma erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 2000 x g, RT) von 9 ml Blut in der EDTA-Monovette. Das überstehende Plasma wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben für die Bestimmung der Proteinexpression ARE-abhängige Enzyme wurden unbehandelt nun bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

### 4.4.5 Urinproben

Es wurde 50 ml- Reaktionsröhrchen vorbereitet. Die Probanden erhielten diese Röhrchen vor jeder Blutentnahme und befüllten sie mit 5 ml ihres Urins. Die Urinproben wurden direkt auf Eis gelagert und Kooperationspartner abgegeben.

## **4.5 Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay)**

### **4.5.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

- Objektträger einseitig komplett mattiert; 26 x 76 x 1,0 mm (Menzel, Braunschweig)
- Deckgläser 24 x 24 mm (Menzel, Braunschweig)
- Elektrophoresekammer für horizontale Gelelektrophorese (Biorad Sub Cell GT)
- Wasserbad (Julabo)
- Färbekammern für die Mikroskopie
- Zeiss Axioskop 20; Filter Set 15 (Anregung BP 546/12; Emission LP 590) mit Cohu High Performance CCD Camera
- Auswertungsprogramm: Comet IV (Perceptive Instruments, Suffolk, England)

### **Chemikalien/Gebrauchslösungen**

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| - Phosphatpuffer (PBS):               | 8,0 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$<br>mit aqua bidest. auf 1L auffüllen, mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen  |
| - Agarose:                            | Low melting point [37°C] (LMA) (Biorad)<br>Normal melting point [42°C] (NMA) (Biorad)  |
| - NMA (Beschichtung der Objektträger) | 0,5% in PBS  |
| - LMA (Suspendieren der Zellen)       | 0,7% in PBS  |
| - Lyse-Puffer: (Stammlösung) :        | 2,5 M = 146,1 g NaCl<br>100 mM = 37,2 g EDTA-Dinatriumsalz<br>10 mM = 1,2 g Tris<br>in 1 L aqua bidest. lösen und mit NaOH auf pH 10 einstellen<br><br>danach 10 g N-Laurylsarcosin-Na-Salz dazugeben, auf 1 L auffüllen |
| Lyse-Gebrauchslösung:                 | 89% Lyse-Stammlösung<br>10% DMSO<br>1% Triton X-100 (Aldrich)  |
| - Enzympuffer (Stammlösung):          | 40 mM = 9,5 g HEPES<br>0,1 mM = 7,46 g KCl<br>0,5 mM = 0,146 g EDTA  |

	0,2 mg/L = 0,2 g BSA
	auf 1 L aqua bidest. auffüllen, mit KOH auf pH 8 einstellen; als 10x-Stammlösung bei -20°C aufzubewahren in 35 ml Portionen
Gebrauchslösung:	Verdünnung der Stammlösung 1/10; kühlen
- FPG-Enzym:	200 µl Enzympuffer 200 µl Glycerin auf 2 m mit aqua bidest auffüllen davon 990 µl + 10 µl Enzym = 1/100 aufzuteilen auf 25 µl- Portionen Lagerung im Tiefkühlschrank bei -84°C
Enzym-Gebrauchslösung:	25 µl Enzym + 725 µl Enzympuffer = Verdünnung 1/30; insgesamt 1/3000
Elektrophoresepuffer (Stammlösungen):	10 mM = 200 g NaOH auf 500 mL aqua bidest. 200 mM = 14,9 g EDTA auf 200 mL aqua bidest.
Gebrauchslösung:	30 mL NaOH-Lösung 5 ml EDTA-Lösung auf 1 L mit aqua bidest auffüllen, kühl stellen
Neutralisationspuffer:	0,4 M = 48,5 g Tris auf 1 L aqua bidest. auffüllen, auf pH 7,5 (mit HCl)
Objektträgerfixierung:	95% Ethanollösung
Ethidiumbromidlösung (Stammlösung):	10 mg in 50 ml aqua bidest.
Gebrauchslösung:	10% (v/v) in aqua bidest.

### 4.5.2 Durchführung

Die Durchführung des alkalischen Comet Assays entspricht weitestgehend der Beschreibung nach Collins *et al.*, die schematisch in Abb. 3-28 dargestellt ist [Collins *et al.*, 1996]. Vor der Durchführung wurden die Objektträger mit NMA präpariert: 40 µL wurden auf die matte Seite pipettiert, ausgestrichen und trocknen gelassen. Sodann wurden darauf zweimal nebeneinander je 65 µL NMA pipettiert und sofort mit je einem Deckglas bedeckt. Die Aufbewahrung, die max. eine Woche betragen sollte, erfolgte bei 4°C in angefeuchteten Präparationskästen. Die Zellsuspension wurde gut vereinzelt und auf je vier Reaktionsgefäße á 60-70.000 Zellen verteilt und für 10 min bei 4°C und 2.000 Upm abzentrifugiert. Der Rest wurde für die Bestimmung der

Viabilität verwendet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 65 µL verflüssigte LMA aufgenommen, auf die zuvor mit NMA präparierten Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Wurden nicht Zellen für den Comet Assay eingesetzt, sondern Vollblut aus der Interventionsstudie, dann wurde direkt 6 µL Blut mit 65 µL LMA vermischt und auf den präparierten Objektträger pipettiert. Nach Festwerden der LMA und nach Abziehen der Deckgläser wurden die Objektträger in eine mit Lysepuffer gefüllte Kammer gestellt und für mindestens 1 h bei 4°C belassen. Nach der Lyse wurden die Objektträger dreimal mit Enzympuffer gewaschen. Auf die Objektträger wurden nun 50 µL Enzympuffer als Kontrolle bzw. 50 µL FPG Lösung pipettiert und nach Auflegen von Deckgläsern wurden sie 30 min im Wasserbad bei 37°C belassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Deckgläser wieder entfernt und die Objektträger in die horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Bedeckt mit Elektrophoresepuffer (pH 13) wurde 20 min inkubiert (Entwindung der DNA) und sodann die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Anfangsstromstärke von 300 mA gestartet. Die Dauer betrug 20 min. Nun wurden die Objektträger dreimal mit Neutralisationspuffer neutral gewaschen und 5 min in 95% Ethanollösung fixiert. Am Ende wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid auf die Gele aufgetragen (40 µl) und mit Deckgläsern bedeckt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axioskop, die Auszählung der Zellen bzw. die Quantifizierung mit dem Computerprogramm Comet IV. Dazu wurden je Gel 50 Zellen ausgezählt, das Programm errechnete die entsprechenden Parameter. Zur Auswertung wurde die tail intensity (die prozentuale Fluoreszenzintensität des Schweifes relativ zur Gesamtintensität) herangezogen.

### **4.6 *Dichlorfluorescein (DCF)-Assay***

#### **4.6.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

##### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- 96-Lochplatten, steril, schwarz, mit klarem Boden (Corning)
- Multipette (Abimed) mit sterilen Aufsätzen (Eppendorf, Axon)
- braune 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt)
- Rotlichtlampe (Osram)
- Multiplattenphotometer (Sirius HT) mit Software KC4 v.3.3. BioTek®



Lösungen:

- Inkubationsmedien, Antioxidanzien, Oxidanzien
- PBS aus Zellkultur, auf pH 7,0 eingestellt
- 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat-Lösung (Fluka): 10 mM in DMSO lösen (= 4,89 mg/ml)  
im braunen Reaktionsgefäß einwiegen, im Dunkeln bis zur Messung aufbewahren, pro Tag frisch ansetzen
- Gebrauchslösung: 5 µL Lösung pro mlPBS (7,0) = 50 µM  
(dunkel!)

### 4.6.2 Durchführung

Basierend auf der Methode nach Wang und Joseph wurde der modifizierte Assay verwendet [Schäfer, 2006; Wang and Joseph, 1999b].

HT-29 Zellen wurden in 96-Lochplatten zu je  $3,2 \cdot 10^4$  Zellen pro Loch ausgestreut. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium im Brutschrank anwachsen gelassen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den Antioxidantien, für Kontrollversuche mit 0,1% DMSO im Inkubationsmedium inkubiert.

#### ***Inkubation mit DCFH-DA und Oxidantien***

Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Danach wurden die Zellen 30 min mit 50 µM DCFH-DA im Brutschrank inkubiert. Alle Arbeiten ab Zugabe von DCFH-DA erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs im Dunkeln (Rotlicht).

Nach dem Entfernen des überschüssigen Farbstoffs und zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurden die Zellen mit dem Oxidans versetzt und die Fluoreszenzintensität sofort mittels Plattenreader gemessen.

#### ***Messung und Auswertung***

Die fluorimetrische Messung erfolgte sofort (0 min) und nach 40 min. Folgende Messparameter lagen der Messung zugrunde:

Messmodus:	Fluoreszenz
Temperatur:	37°C
Anregungswellenlänge:	485 nm
Emissionswellenlänge:	525 nm
Lesemodus:	Bottom
Sensitivität:	70
Anzahl der Anregungen pro Messung:	10

Berechnet wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI%) pro Loch analog der Rechnung nach [Wang and Joseph, 1999] wie folgt:

$$FI \% = \frac{F_{40min} - F_{0min}}{F_{0min}} \times 100$$

$F_{40\ min}$  = Fluoreszenzintensität nach 40 min Inkubationsdauer

$F_{0\ min}$  = Fluoreszenzintensität bei 0 min Inkubationsdauer

Aus den Ergebnissen für die einzelnen Löcher wird der Mittelwert berechnet und grafisch aufgetragen.

## **4.7 Glutathionbestimmung**

### **4.7.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- Multiplattenreader (Sirius HT) mit Software Gen5; BioTek®
- 96-Lochplatte (Greiner)
- Mikroreaktionsgefäße 2,2 und 1,5 ml (Greiner)
- Minifuge (Heraeus)

- Megafuge 1.0R (Heraeus)
- Multipette (Abimed)

### **Lösungen**

- Puffer A:  
1,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
234 mg  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ,  
in 100 ml aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Puffer B:  
2,175 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  
234 mg  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ,  
in 100 ml Aqua bidest. lösen, Lagerung bei 4 °C
- Gebrauchslösung: ((A+B)-Puffer):  
15 ml Puffer A + 85 ml Puffer B; pH 7,5  
am Tag des Versuchs frisch ansetzen
- $\text{NaHCO}_3$ , 0,5%ig:  
500 mg  $\text{NaHCO}_3$  lösen in 100 mL aqua bidest.  
Lagerung bei 4 °C
- NADPH-Lösung:  
20 mmol/L in 0,5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung = 18 mg  
NADPH/ ml
- DTNB-Lösung (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) (Sigma): 6 mmol/L  
24 mg DTNB lösen in 10 ml (A+B)-Puffer, frisch  
ansetzen
- Glutathion-Reduktase (GSR) (Sigma-Aldrich):  
1 U Glutathion-Reduktase/ 10 µl (A+B)-Puffer
- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA)  
10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.  
5%ig: 50 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.  
Lagerung bei 4°C
- Glutathion, oxidiert (GSSG) (Acros)
- Glutathion, reduziert (GSH) (Sigma-Aldrich)
- Vinylpyridin (Fluka)
- Triethanolamin (Fluka) (TEA) 50%ig in aqua bidest.

## 4.7.2 Durchführung

Nach dem Auftauen der Proben aus der Interventionsstudie (gewonnen gemäß 4.4.3) erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 6000 Upm für 15 min. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und zur tGSH-Bestimmung wurden 100 µl mit 900 µl 5% SSA verdünnt (Endverdünnung 1:50). Da GSSG in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vorlag, wurde es nur bis zu einer Endverdünnung von 1:25 verdünnt (200 µl Überstand + 800 µl 5% SSA).

### 4.7.2.1 Messung von tGSH (Glutathionspiegel)

Ausgehend von einer GSH-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA Glutathion-Standards folgender Konzentrationen [µM GSH] hergestellt: 160 80 40 20 10 5 0 (Blank).

### **Messung per Mikroplattenphotometer**

Die tGSH-Messung erfolgt analog der Methode, die von Gallagher beschrieben wurde [Gallagher *et al.*, 1994a]:

In die 96-Lochplatte wurden 10 µl Probe oder Standard vorgelegt, pro Well dann die Reaktionsmischung aus 164 µl Puffer A+B, 20 µl DTNB (6 mM), 4 µl NADPH (20 mM) und 2 µl GSR (100 U/ml) zugegeben. Alle Standards und Proben wurden als Doppelbestimmung vermessen. Die Glutathion-Reduktase (GSR) wurde als letztes zupipettiert, da sie die Farbreaktion startet.

Folgende Parameter sind im Protokoll festgelegt:

Messmodus:	Absorption
Lesemodus:	Endpunkt
Temperatur:	25°C
Wellenlänge:	412 nm
Lesemodus:	Top

### **Auswertung**

Zur Auswertung wurde die Differenz der Extinktionen bei  $t=10$  min und  $t=0$  min gebildet:

$$\Delta E = E(t=10 \text{ min}) - E(t=0 \text{ min})$$

Diese Werte wurden noch korrigiert, indem der  $\Delta E$ -Wert des Blindwerts subtrahiert wurde. Die korrigierten  $\Delta E$ -Werte der GSH-Standards wurden in einem Diagramm gegen ihre Konzentrationen aufgetragen und so die Regressionsgerade bestimmt.

Anhand der Geradengleichung ließen sich nun die Extinktionen (korr.  $\Delta E$ -Werte) der Proben in die tGSH-Konzentration (in  $\mu\text{M}$ ) umrechnen.

#### **4.7.2.2 Messung von GSSG**

GSSG-Standardreihe

Ausgehend von einer GSSG-Stammlösung von 1 mM wurden mit 5% SSA GSSG-Standards folgender Konzentrationen [ $\mu\text{M}$  GSSG] hergestellt: 40 20 10 5 2,5 1,25 0 (Blank).

### **Derivatisierung**

Zur Derivatisierung des Glutathions wurden in dieser Reihenfolge

Probe/ Standard/ Blank	500 $\mu\text{l}$
2-Vinylpyridin	20 $\mu\text{l}$
50% TEA	100 $\mu\text{l}$

in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und gut geschüttelt. Die Derivatisierung erfolgte im Thermomixer für 1 h bei  $26^\circ\text{C}$  und 600 Upm.

### **Messung**

Der Messablauf entsprach weitgehend dem der tGSH-Messung.



## **4.9 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot**

### **4.9.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Chemolumineszenzdetektor:	Lumilmager (Böhringer)
Software:	LumiAnalyst 3.1 (Böhringer)
Western Blot Gelkammer:	Mini Protean Tetra Cell (Bio Rad)
Western Blot Transferkammer:	Semiphor (Hoefer Scientific Instruments)
Western Blot Spannungsquelle:	Power Pac 300 (Bio Rad)
Biofreezer:	Herafreeze (Heraeus)
Vakuumfolienschweißgerät:	(TCM)
Überkopfschüttler:	RK10-VS (Heto Lap Equipment)
Vortexter:	MSI Minishaker (IKA)
Ultraschall-Homogenisator:	Labsonic 2000 (B.Braun)
Thermomixer:	Thermomixer comfort (Eppendorf)

#### **Chemikalien/Gebrauchslösungen**

Nitrocellulose Transfer Membran:	Whatman Protean (VWR)
Gel – Blotting Papier:	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	ICN, Biomedicals, Inc.
n-Butanol	Fluka
Bromphenolblau	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
EDTA	Merck
Ethanol	Roth
Glycin	Merck
HCl	Merck,
HRP Western Blot Detektions System:	20x LumiGlo Reagent (Reagent A) 20 x Peroxide (Reagent B) Cell Signalling Technology
Katalase	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

## Material und Methoden

---

Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel-de-Häen
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Roth
SDS ultrapure	AppliChem
TEMED	Roth
Tris ultra Qualität	Roth
Tween-20 SigmaUltra	Sigma-Aldrich
Protein-Marker	Standard See Blue plus 2 (Invitrogen)
Antikörper	Santa Cruz
- Lyse-Puffer für Ery's: (Stammlösung):	150mM = 8,77 g NaCl 5 mM = 1,86 g EDTA-Dinatriumsalz 10 mM = 1,2 g Tris in 1 L aqua bidest. lösen
- Lyse-Gebrauchslösung:	89% Lyse-Stammlösung 10% DMSO 1% NP-40 (Igepal) (Aldrich)
- Tris/HCl (1,5M):	181,71 g Tris, ad 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 8,8 bei RT gelagert
- Tris/HCl (0,5 M):	60,57 g Tris, ad 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 6,8 bei RT gelagert
- APS (10%):	0,1g APS ad 1ml ddH <sub>2</sub> O bei 4°C gelagert
- SDS (10%):	10 g SDS 100 ddH <sub>2</sub> O bei RT gelagert
- Laufpuffer (10x):	2M (300g) Glycin 250mM (60,57g) Tris 20 g, 1%(w/v) SDS



## Material und Methoden

---

- ad 2 l ddH<sub>2</sub>O  
pH 8,3; bei RT gelagert
- Ladepuffer (6x): 50 ml Tris/HCl 0,5 M  
0,16 g Bromphenolblau  
1,24 g SDS  
40 ml Glycerin  
5 ml 2-Mercaptoetanol  
ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O  
bei 4°C gelagert
- Blotting-Puffer (2x): 78 mM (11,7 g) Glycin  
96 mM (23,3 g) Tris  
0,074% (w/v) (1,48 g) SDS  
(v/v) (800 ml) Methanol  
bei RT gelagert
- TBS (20x): 2,6 M (303,9 g) NaCl  
0,4 M (96,9 g) Tris  
ad 2 l ddH<sub>2</sub>O  
pH 7,6; bei RT gelagert
- TBS/ 0,1 % Tween-20: 1x 50ml TBS (20x)  
0,1% (1ml) Tween-20  
ad 1l ddH<sub>2</sub>O; bei RT gelagert
- Blocking-Reagenz (Milchpulverlösung): 250 ml TBS / 0,1% Tween-20  
5% (12,5g) Milchpulver  
bei RT gelagert
- Waschlösung: 1x 250 ml TBS(20x)  
0,3% (15ml) Tween-20  
ad 5l ddH<sub>2</sub>O; bei RT gelagert
- HRP Western Blot Detektions System: 250 µl 20x LumiGlo Reagent (Reagent A)  
250µl 20 x Peroxide (Reagent B)  
ad 4,5 ml ddH<sub>2</sub>O  
(für 1 Membran)

## **4.9.2 Durchführung**

### *4.9.2.1 Probenaufarbeitung*

Nach Inkubation der Zellen gemäß 4.2.3 wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen mit 6 ml (60 mm-Platten) PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und mit 100 µl RIPA-Puffer + 0,1 % Protease Inhibitor Cocktail versetzt, um die Zellen zu lysieren. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels eines Ultraschallhomogenisators für wenige Sekunden bei 10-40 kHz homogenisiert. Im Anschluss daran wurde das Zelllysatz zentrifugiert (5 min, 5.000 g, 4 °C) und aus dem Überstand wurde Proteinbestimmung nach Bradford (s.4.8) durchgeführt.

### *4.9.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Der Proteingehalt der Proben wurde je nach untersuchten Proteinen auf entsprechende Konzentrationen eingestellt. Die Proben wurden mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Gelherstellung wurden zunächst die Trenngele mit 12 % Acrylamid in die Gelkammern gegossen. Bis zur vollständigen Polymerisation der Trenngele wurden diese mit n-Butanol überschichtet. Nach Entfernen des n-Butanols wurde ein 4 %-iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgel (1x)**

<b>SDS-Gel Herstellung</b>	<b>12 % Trenngel</b>	<b>4 % Sammelgel</b>
Acrylamid 30%	1,97 ml	0,25 ml
1,5M Tris pH	1,23 ml	-
0,5M Tris pH	-	0,5 ml
H <sub>2</sub> O (bidest.)	1,72 ml	1,2 ml
10% SDS	49,2 µl	20 µl
TEMED	2,46 µl	2 µl
APS	24,6 µl	20 µl

Jede Geltasche wurde mit 30µg (NQO1) bzw. 60µg (γ-GCL) der denaturierten Proben beladen. Um einerseits das Molekulargewicht des zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen und zusätzlich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine zu folgen, wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard (See Blue Plus 2) mitgeführt. Die Elektrophorese wird nach dem Auffüllen der Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer (1x) gestartet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wird mit einer Spannung von U= 150V durchgeführt, die jedoch nach dem Übertreten der Proteine ins Trenngel auf U=180V erhöht werden kann.

#### *4.9.2.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper*

Im Anschluss an die SDS-PAGE folgt der Western Blot. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels „semi-dry-Blot“ in Anwesenheit von 1x Blotting-Puffer. Die Membran und das Gel befinden sich während des Blottens zwischen vier in Blotting-Puffer getränkte Whatman-Papiere. Abschließend wurde die Kathodenplatte aufgebracht (Abb. 3-33) und ein Gewicht von etwa 1kg, um einen guten Kontakt zu gewährleisten. Der Transfer fand unter einer konstanten Spannung von 50 mA pro Gel für 90 min statt. Nach dem Bloten wurde die Membran in Blocking-Puffer überführt und 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend wurden die Membranen dreimal fünf Minuten mit Waschlösung

gewaschen und für eine Stunde oder alternativ bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper in der angegebenen Konzentration (siehe Tab. 4-2) in 80 mg BSA + 2 ml 1x TBS/0,1 % Tween-20 inkubiert (RT, leichtes Schütteln). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurde die Membran für 1h mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4-2) in Blocking-Reagenz schüttelnd inkubiert.

**Tabelle 4-2: Eingesetzte Primär- und sekundärantikörper**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
NQO1 Maus monoclonal Ig G <sub>1</sub>	1:1000	goat anti mouse IgG <sub>1</sub> -HRP	1:1000
Glutathione-Reductase rabbit polyclonal IgG	1:200	goat anti rabbit IgG-HRP	1:1000
γ-GCSc, rabbit polyclonal IgG	1:200	goat anti rabbit IgG-HRP	1:1000
α-Tubulin Mouse monoclonal IgG <sub>2a</sub>	1:1000	goat anti mouse IgG <sub>1</sub> -HRP	1:1000
β-Actin Mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	1:10000	goat anti mouse IgG <sub>1</sub> -HRP	1:1000
GAPDH Mouse monoclonal IgG1	1:5000	goat anti mouse IgG <sub>1</sub> -HRP	1:1000

Nach einem weiteren Waschen wurde die Membran für eine Minute mit LumiGlo Reagenz benetzt. Die Detektion und semiquantitative Auswertung erfolgten mittels Lumi-Imager mit der Lumi Analyst 3.1 Software.

#### **Auswertung:**

Bei der Durchführung jeder Western Blot-Analyse wurde eine interne Beladungskontrolle mitgeführt. Als solche dienten sog. Housekeeping-Gene, welche in allen Geweben konstitutiv exprimiert werden. In Tabelle 4-3 sind die gängigsten Housekeeping-Gene für den Western Blot aufgelistet.

**Tabelle 4-3: Hauskeeping Gene**

Housekeeping-Gen	Molekulargewicht
GAPDH	37 kDa
β-Actin	43 kDa
α-Tubulin	55 kDa

Das zu untersuchende Protein und die interne Beladungskontrolle wurden gleichzeitig auf einer Membran detektiert. Die erhaltenen absoluten Chemolumineszenz Intensitäten (CI) der Proteinbanden des zu untersuchenden Proteins (Zielenzym) wurden dann sowohl auf die interne Beladungskontrolle (Interne Kontrolle) als auch auf die unbehandelte Kontrolle (DMSO) bezogen. Auf diese Weise ist man in der Lage, die bei der Beladung der Geltaschen auftretenden geringen Unterschiede in der Proteinmenge auszugleichen und den dadurch entstehenden Fehler zu minimieren.

$$(f = CI_{\text{Zielenzym}} / CI_{\text{interne Kontrolle}})$$

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative Chemolumineszenz Intensität bezogen auf die Kontrolle (rel.CI % t/c).

$$CI [\% \text{ t/c}] = [f_{\text{treated}} / f_{\text{solvent control}}] \times 100$$

## **4.10 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)**

### **4.10.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Lösungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 96-Lochplatte, unsteril (Greiner)
- Achtkanalpipette (Abimed)
- Zentrifuge Sigma 3-1 (Sigma)

#### **Chemikalien/Lösungen**

- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz ABTS(Sigma)

7 mM in aqua bidest.

- Aktivierung der Radikallösung durch Kaliumperoxodisulfat (Sigma)

2,45 mM in ABTS-Lösung

über Nacht im Dunkeln

Gebrauchslösung: ca. 1:30 Verdünnung: Absorption auf  $0,70 \pm 0,02$  einstellen

- Trolox: Stammlösung 3 mM in DMSO

- 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) 10%ig: 100 g 5-SSA in 1 L aqua bidest.

- PBS (Stammlösung 10x): - 90 g NaCl

- 7,26 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

- 2,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

mit aqua bidest. auf 1L auffüllen; pH 7,2-7,4  
vor Gebrauch 1/10 verdünnen und steril autoklavieren

### 4.10.2 Durchführung

Die Methode entspricht weitgehend der Beschreibung von [Re *et al.*, 1999]. Von den zu messenden Einzelsubstanzen wurden zunächst 1-3 mM Stammlösungen in DMSO angesetzt. Aus diesen wurden durch verdünnen mit DMSO Lösungen mit den Konzentrationen 1,5 1 0,75 0,5 0,25 0,125 und 0,0625 [mM] hergestellt. Zur Messung der Kaffeeextrakte wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und aus dieser eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 5 2,5 1,25 und 0,625 [mg/ml] durch Verdünnung mit DMSO hergestellt.

Zur Messung des TEAC-Wertes wurden aus jeder Lösung 2  $\mu\text{l}$  entnommen und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Ferner wurden noch 2  $\mu\text{l}$  des Lösungsmittels DMSO (Kaffeinhaltstoffe) bzw. bidest. Wasser (Kaffeeextrakte) als Nullwert in die Platte pipettiert. Auf jeder Platte wurde eine Doppelbestimmung der Referenzsubstanz Trolox und zwei Doppelbestimmungen der zu messenden Antioxidantien durchgeführt.

Zu den vorgelegten 2  $\mu\text{l}$  in der Platte wurden nun 198  $\mu\text{l}$  der eingestellten und auf 30°C temperierte ABTS-Radikal-Lösung hinzu gegeben, was einer Verdünnung von 1:100 entspricht. Bei der „klassischen“ TEAC-Bestimmung erfolgte die Messung nach 6 min bei der Wellenlänge 734 nm am Mikroplattenphotometer.

### **Auswertung:**

Für die Bestimmung der TEAC-Werte wurde zunächst das Ausmaß der Entfärbung, bezogen auf die DMSO-Kontrolle [E%], berechnet:

$$E \% = \frac{Ex_K - Ex_P}{Ex_K} \times 100$$

$Ex_K$  = Absorption der DMSO-Kontrolle

$Ex_P$  = Extinktion der Probe

Die E%-Werte von Trolox bzw. der zu untersuchenden Substanzen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Steigungen der erhaltenen Geraden miteinander verrechnet.

$$TEAC = \text{Steigung}_{\text{probe}} / \text{Steigung}_{\text{Trolox}}$$

## **4.11 Oxygen radical absorption capacity (ORAC)**

### **4.11.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- Multiplattenreader Synergy 2 (Bio Tek)
- Software Gene 5 (Bio Tek)
- Schwarze 96-Lochplatte, unsteril (Nunc)
- Multipette (Abimed)

#### **Chemikalien/Lösungen**

Phosphatpuffer	221 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6 mmol/L) 1,494 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10,5 mmol/L) 8,766 g NaCl (150 mmol/L) lösen in 0,8-0,9 L $\text{H}_2\text{O}$ bidest. Einstellen auf pH 7,4 mit HCl bzw. NaOH auffüllen auf 1 L mit $\text{H}_2\text{O}$ bidest. Lagerung bei 4°C
NaOH-Lösung	4 g NaOH (2 mol/L) lösen in 50 ml $\text{H}_2\text{O}$ bidest.

### Fluorescein-Stammlösung I (0,6 mmol/L)

5,6 mg Fluorescein-Natrium (Sigma 46960)

lösen in 25 ml Phosphatpuffer, + 1 Tropfen NaOH-Lösung

Lagerung bei 4°C max. 4 Wochen

### Fluorescein-Stammlösung II (0,12 mmol/L)

2 ml Fluorescein –Stammlösung I

verdünnen mit 8 ml Phosphatpuffer, (1:5-Verdünnung)

Lagerung bei 4°C max. 2 Wochen

### Fluorescein-Arbeitslösung (1,2 µmol/L)

100 µl Fluorescein-Stammlösung II

verdünnen mit 9,9 ml Phosphatpuffer (1:100 Verdünnung)

Täglich frisch herstellen

### AAPH-Lösung (129 mM)

875 mg AAPH ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Azodiisobutyramidine dihydrochloride, Sigma

11633) lösen in 25 ml Phosphatpuffer

Täglich frisch herstellen

### Trolox-Stammlösung (100 mmol/L)

25 mg Trolox lösen in 1ml DMSO

Täglich frisch ansetzen

Trolox Verdünnungsreihe : 100/40/20/10/5/2,5/1,25 mM

## 4.11.2 Durchführung

Von den zu messenden Einzelsubstanzen und Extrakten wurden zunächst 20 mM (in DMSO) bzw. 20 mg/ml (in H<sub>2</sub>O bidest) Stammlösungen angesetzt. Aus diesen wurde dann jeweils eine Reihe mit den Konzentrationen 20/10/2/1/ mM bzw. mg/ml hergestellt. Parallel wurde eine Trolox Verdünnungsreihe 100/40/20/10/5/2,5 [mM] in DMSO angesetzt. Die Proben, die Standards und der Blank wurden dann nochmals mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:200 verdünnt (5 µl Probe in DMSO +995 µl Puffer bzw. 5 µL Kaffeeextrakte in H<sub>2</sub>O bidest + 5 µl DMSO + 990 µl Puffer), sodass wässrige (0,5% DMSO) mit folgenden Konzentrationen entstanden:

Trolox [µM]: 6,25/12,5/25/50/100/200/500

Probe [µM] bzw. [µg/ml]: 5/10/50/100

Zur Messung des ORAC-Wertes wurden aus jeder Probe/Standard/Blank-Lösung 20µl entnommen und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zu den vorgelegten 20 µl in der Platte wurden 100 µl Phosphatpuffer hinzugegeben. Anschließend wurde die



Mikroplatte ins Gerät gestellt und die Messung gestartet. Dabei wurden nachfolgende Schritte vom Photometer durchgeführt:

- Zugabe von 25 µl Fluorescein-Arbeitslösung
- Temperierung auf 37 für 10 min
- Messung der Fluoreszenz (0-90 min), bei t=6min: Zugabe von 100µl AAPH-Lösung zum Starten der Reaktion

Methode Synergy 2: ORAC. Prt.

1. Temperature setpoint 37 °C
2. Plate einfahren
3. Start synchronized plate mode
  - Dispense 25 µl aus Dispenser 1 (Fluorescein-Lösung)
  - Delay 10 Minuten
  - Start kinetic (Run time 4 min; Interval 2 min); Read Fluorescence Ex / Em: 485 /528
  - End kinetic
  - Dispense 100 µl aus Dispenser 2 (AAPH-Lösung)
  - Shake medium for 5 sec
  - Start kinetic ( Run time 1h26 min; Interval 2 min)Read Fluorescence Ex / Em: 485/528
  - End kinetic
4. End synchronized plate mode

### **Auswertung:**

1. Berechnung der Area Under Curve (AUC)
2.  $AUC_{net} = AUC_{probe/Standard} - AUC_{Negativkontrolle}$
3. Lineare Regression der Standards (6,25-500 µmol/L Trolox gegen deren  $AUC_{net}$ )
4. Lineare Regression der Probe(1-50 µmol/L gegen deren  $AUC_{net}$ )
5. Berechnung des ORAC-Wertes:

$$ORAC = \text{Steigung}_{probe} / \text{Steigung}_{Trolox}$$

## **4.12 Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )- Bestimmung**

### **4.12.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen**

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- Multiplattenreader (Sirius HT)
- 24/96-Lochplatte, unsteril (Greiner)
- Achtkanalpipette (Abimed)
- Zentrifuge Sigma 3-1 (Sigma)
- Brutschrank Heraeus Cytoperm BBD 6220

#### **Chemikalien/Lösungen**

Wasserstoffperoxid 37%, stabilisiert (VWR)

Ammonium Eisen (II) sulfat (Merk)

Sorbitol (Aldrich)

Xylenol-Orange (Sigma)

Perchlorsäure: Dichte: 1670 g/L  
M = 100,46 g/mol  
⇒ Lösung von 16,6 M

11 M Perchlorsäure: 3,38 ml  $H_2O$  + 6,62 ml Perchlorsäure 16,6 M

Reagenz A: 98 mg Ammonium Eisen(II)sulfat  $(NH_4)_2Fe^{2+}(SO_4)_2$  (= 25 mM)  
lösen in 10 ml 11 M Perchlorsäure

Reagenz B: 9,108 g Sorbitol (= 100 mM)  
47,54 mg Xylenol-Orange (= 125  $\mu$ M)  
lösen in 500 ml Wasser

Gebrauchslösung: 1 Teil Reagenz A + 100 Teile Reagenz B  
z.B. 200  $\mu$ l A + 20 ml B

#### **4.12.2 Durchführung**

##### **Substanzinkubation:**

Zunächsts wurden die Lösungen mit den Konzentrationen 10/1/0,1 mM DMSO der Kaffeeinhaltsstoffe (in DMSO) bzw. 25/10/1 mg/ml bidest. Wasser der Kaffeeextrakte hergestellt. Zur Inkubation wurde aus jeder dieser Lösungen eine mit Inkubationsmedium (I-Med) 1:100 Verdünnung hergestellt und 24 h im Brutschrank belassen. Eine Kontrolle wurde mit DMSO (1%) bzw. bidest Wasser mitgeführt.

##### **Herstellung der $H_2O_2$ Standards:**

Ausgehend von einer  $H_2O_2$ -Stammlösung von 1 M wurden mit bidest. Wasser  $H_2O_2$ -Standards folgender Konzentrationen hergestellt: 100 / 50 / 10 / 5 / 1 / 0  $\mu M$ .

##### **Messung und Auswertung:**

Nach erfolgter Inkubation wurden jeweils 20  $\mu l$  der frisch angesetzten  $H_2O_2$ -Standardlösungen, der Substanzlösungen und der Kontrolllösungen in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden mit der Mehrkanalpipette 200  $\mu l$  Gebrauchslösung in jedes Well gegeben und die Platte 20 min bei RT im Plattenreader inkubiert. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 595 nm. Durch Messung der Extinktion von  $H_2O_2$ -Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen wurde über lineare Regression eine Geradengleichung berechnet, in welche die gemessenen Extinktion der Proben eingesetzt und so der jeweilige Gehalt an  $H_2O_2$  bestimmt wurde.

### ***4.13 Erfassung von Körpergewicht/-größe und Körperzusammensetzung***

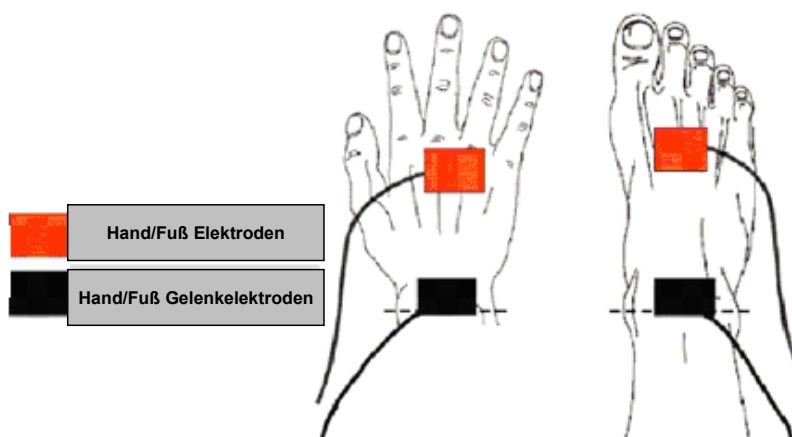
#### **4.13.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

- medizinische Personenwaage (Seca delta 707)
- Rollmessband (Seca 206)
- Maltron-Bioimpedanz-Analysegerät (Maltron, BF-906)
- Einmalelektroden zur BIA -Messung (Maltron)
- Kalibrierungs-Resistor (Maltron)
- Kabelset (Maltron)

- Batterie 9V
- Medizinische Liege

### 4.13.2 Durchführung

Während der vier Untersuchungstermine (2. Humanstudie) wurden Körpergewicht und Körperzusammensetzung der Probanden erfasst. Hierfür wurden die Probanden morgens nüchtern und nur mit Unterhose bekleidet gewogen; unmittelbar anschließend wurde die Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse (s. 3.7.10) am liegenden Probanden gemessen. Zur Durchführung der BIA wurden den Probanden an der rechten Körperseite vier Kontaktelektroden angelegt: an der Hand, am Handgelenk, am Fuß und am Fußgelenk. Vier Kabel stellen die Verbindung zwischen Gerät und den vier Kontaktelektroden (Abbildung 4-2). Ein schwacher Stromfluss wurde mit einer Frequenz von 50 KHz über die Elektroden an Hand und Fuß geleitet.



**Abbildung 4-2: Lage der Elektroden während der Messung der BIA**

Der Spannungsabfall aufgrund des Widerstandes der Körpermaße wird über die beiden Elektroden aufgezeichnet. Die Messung im Liegen erlaubt eine ausgeglichene Verteilung der Flüssigkeit im Körper und sorgt für sehr genaue Messergebnisse. Anhand der berechneten Impedanz (Resistanz und Reaktanz), sowie der Körpergröße und des Körpergewichtes liefert das Gerät unter Verwendung bestimmter Algorithmen (gewonnen aus einer sehr umfangreichen Datenbasis) Angaben zum Körperwassergehalt, zur fettfreien Körpermaße und zum Körperfettanteil (Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4: Messbare Parameter des Maltron-Bioimpedanz-Analysegerätes BF-906**

K.Fett %	(Körperfettanteil prozentual)
K.Fett kg	(Körperfettanteil absolut)
Z.Fett %	(persönlicher Normbereich)
BMI / Wid	(Body-Mass-Index, Körperwiderstand)
GSR Kcal	(Grundumsatz)
Z.Gew.kg	(normaler Gewichtsbereich)
MAMA kg	(Magermasse / fettfreie Masse)
MAMA %	(prozentualer Anteil der fettfreien Masse)
Wasser Lt.	(absoluter Wassergehalt)
Wasser %	(prozentualer Wassergehalt)
Z. Wasser %	(norm. Wassergehalt entspr. Alter, Geschlecht)

## **4.14 Interventionstudien an Probanden**

### **4.14.1 Erste Humanstudie (Pilotstudie)**

Basierend auf bereits publizierten Untersuchungen, in denen N-Methylpyridinium im Tiermodell als antioxidativ wirksame Substanz identifiziert werden konnte [Somoza *et al.*, 2003], wurde eine 12 wöchige Pilotstudie an 30 stoffwechselgesunden Probanden im Rahmen des BMBF-Projektes durch den AG Prof. Somoza in der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA Garching) durchgeführt. Mittels der Studie sollte nun auch beim Menschen die antioxidative Wirkung von Kaffeegetränken in Abhängigkeit des Gehaltes an N-Methylpyridinium und Chlorogensäuren nachgewiesen werden. Die Studie unterteilte sich in vier Phasen: in zwei vierwöchigen Kaffeephasen und zwei zweiwöchigen Wash-out Phasen. In der ersten Kaffeephase erhielten die Probanden den schwach gerösteten Kaffee, der arm an NMP (ca. 5 mg NMP/L) und reich an Chlorogensäuren war (AB 1); in der zweiten Kaffeephase tranken die Studienteilnehmer das Kaffeegetränk mit einem höheren Gehalt an N-Methylpyridinium (ca. 70 mg N-MP/ml, AB 2) (s. 3.6). Während der fünf Blutentnahmen gesammelte Proben wurden unter den Kooperationspartnern

verteilt und auf der Biomarker untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation oxidativer DNA-Schäden im Vollblut der Probanden erfasst.

#### **4.14.2 Zweite Humanstudie**

Aufbauend auf Ergebnissen der Pilotstudie mit Probanden wurde eine **2. Humanstudie** (TU Kaiserslautern) durchgeführt, um die Wirksamkeit eines Kaffees (*Coffea Arabica*) mit besonders hohem Gehalt an Antioxidantien zu untersuchen. Die Röstung der Kaffeebohnen war daraufhin optimiert einen möglichst hohen Gehalt an Chlorogensäuren und an N-Methylpyridinium zu erreichen (s. 3.6).

##### *4.14.2.1 Durchführung der 2. Humanstudie*

#### **Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission**

Am 27.05.2008 wurde der Antrag für die Genehmigung der 2. Humanstudie an die Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Nr. 837.207.08 (6204) gestellt. Am 09.07. 2008 wurde ein positives Votum erteilt.

#### **Rekrutierung der Probanden**

Für die Studie waren 35 männliche, gesunde, an Kaffeekonsum gewöhnte Probanden im Alter zwischen 19-44 Jahren vorgesehen. Ausschlusskriterien waren Tabakkonsum, Einnahme von Medikamenten, Ausübung von Leistungssport, sowie vorhandene Stoffwechselstörungen / Krankheiten. Als Limit für den Body-Mass-Index der Probanden war ein Wert von 32 vorgesehen.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte innerhalb der Technischen Universität Kaiserslautern über Aushänge auf dem Campus und Informationen über das Rechenzentrum (Internet). Die Interessenten wurden zu einer Informationsveranstaltung eingeladen und ausführlich über Design, Ablauf und Dauer der Studie informiert. Hierauf wurden 45 potenziell geeignete Probanden gemäß Ethikvotum einer ärztlichen Untersuchung unterzogen, um sicherzustellen, dass der Gesundheitsstatus den vorgegebenen Kriterien entsprach. Auf der Basis der ärztlichen Voruntersuchung wurden 35 Studienteilnehmer sowie 2 Ersatzteilnehmer ausgewählt, die das Einverständnisprotokoll unterzeichneten.

#### **Darstellung des Studiendesigns und des Prüfablaufs**

In einer 12-wöchigen Interventionsstudie (Abbildung 4-3), die in drei Phasen unterteilt war, konsumierten 35 männliche Probanden zunächst über einen Zeitraum von 4

Wochen täglich 750 ml eines polyphenolfreien Getränkes in drei Portionen über den Tag verteilt (erste Wash-Out Phase). In der nachfolgenden vierwöchigen Interventionsphase tranken die Probanden entsprechend über 4 Wochen täglich 750 ml eines an Antioxidantien reichen Kaffeegetränkes. Anschließend wurden analog über vier Wochen täglich 750 ml eines polyphenolfreien Getränkes konsumiert (zweite Wash-Out Phase). Die Studie beinhaltete vier Untersuchungs- bzw. Blutentnahmetermine.

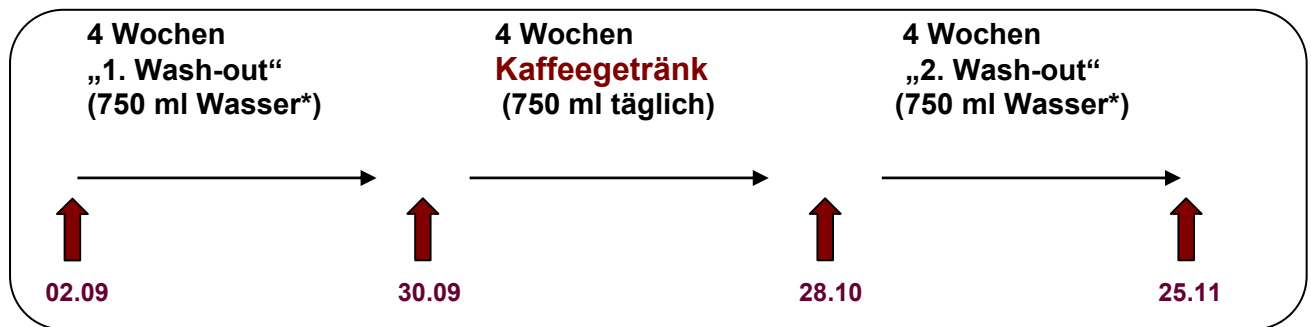


Abbildung 4-3: Studiendesign der Humanstudie

### Zeitlicher Ablauf :

- 2. September 2008: Studienbeginn, Beginn der ersten Wash-out Phase
- 30. September 2008: Ende der ersten Wash-Out Phase, nachfolgend Beginn der Kaffee-Phase
- 28. Oktober 2008: Ende der Kaffee-Phase, nachfolgend Beginn der zweiten Wash- Out Phase
- 25. November 2008: Ende der zweiten Wash-out Phase (Ende der Studie)

### Durchgeführte Untersuchungen:

Zu jedem Untersuchungstermin wurden zunächst Körpergewicht und Körperzusammensetzung der nüchternen Probanden erfasst. Anschließend tranken die Probanden 250 ml Wasser bzw. Studienkaffee; zwei Stunden später wurden jeweils 30 ml Blut durch einen approbierten Arzt (Westpfalzkrankenhaus Kaiserslautern) entnommen und 5 ml Urin gesammelt.

### **Verzehr des Studienkaffees**

In der 4-wöchigen Interventionsphase konsumierten die Probanden täglich 750ml Studienkaffee über den Tag verteilt (in 3 Portionen zu je 250 ml). An den Arbeitstagen wurde für die Probanden das Kaffeegetränk zwischen 13 und 15 Uhr am Studienort (FR Lebensmittelchemie & Toxikologie) frisch zubereitet. Morgens, nachmittags und am Wochenende bereiteten sich die Probanden den Kaffee selbst zu. Hierfür erhielten sie jeweils eine Kaffeemaschine, den Studienkaffee (vakuumverpackt, portioniert für 28 Tage, jeweils 3 Portionen pro Tag), sowie Messbecher, Kaffeefilter und eine Brühanweisung. Für jede Kaffeezubereitung wurde ein Päckchen des Studienkaffeepulvers (ca. 30 g) mit 600 ml Leitungswasser aufgebrüht. Von den so erhaltenen ca. 500 ml an Kaffeegetränk wurden 250 ml konsumiert (ohne Milch, Zuckerzusatz freigestellt). In den Wash-out-Phasen wurde der Kaffee durch gleiche Volumina an Wasser, Milch, Softdrinks oder bestimmten Tees ersetzt.

### **Ernährungsvorgaben während der Studie**

Während des gesamten Studienzeitraums wurden die Probanden anhand eines Merkblatts (s. Anhang) dazu angehalten, auf zusätzliche koffeinhaltige Getränke wie Kaffee, Cola, Tee (schwarz, grün, weiß) zu verzichten. Weiterhin waren Vitaminpräparate, sowie polyphenolreiche Lebensmittel, wie dunkle Schokolade, Rotwein, intensiv gefärbte Obst- und Gemüsesorten und deren Säfte zu meiden. Andere polyphenolhaltige Lebensmittel sollten nur in geringeren Mengen verzehrt werden. Diese Ernährungsvorgaben hatten das Ziel, die Wirkung des koffeinhaltigen und polyphenolreichen Studienkaffees zu verdeutlichen. Ansonsten sollten die Probanden ihre gewohnte Ernährung beibehalten, um Wirkungen des Studienkaffees vor dem Hintergrund einer üblichen Nahrungsaufnahme (Menge und Zusammensetzung) aufzuzeigen.



## Dokumentation der Nahrungsaufnahme

Während folgender Zeiträume wurden die Probanden gebeten, jeweils eine Woche lang alle täglich verzehrten Lebensmittel (Art und Menge) aufzuführen (Abbildung 4-4):

- 23. - 29. September 2008 (erste Wash-out Phase)
- 21. - 27. Oktober 2008 (Kaffeephase)
- 18. - 24. November 2008 (zweite Wash-out Phase)
- 2. - 8. Dezember 2008 (nach Studienende)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>nachdem die Probanden ihre gewohnte Ernährung bereits eine Woche wieder aufgenommen hatten.

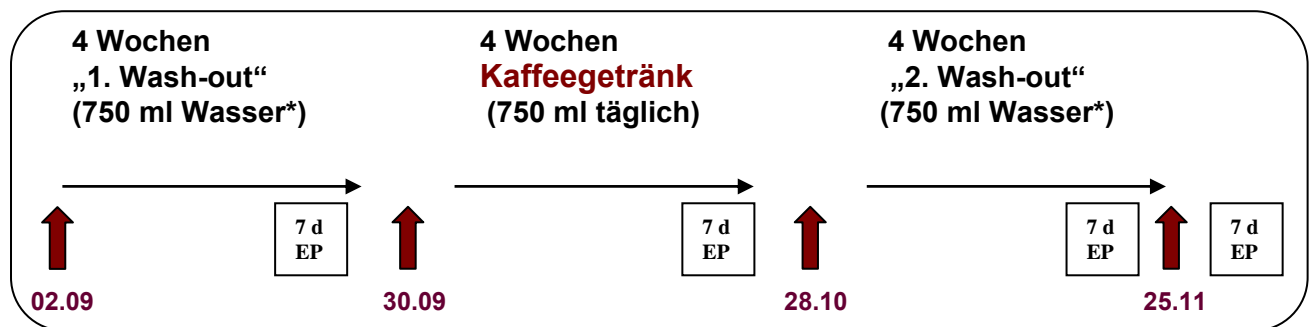


Abbildung 4-4: Erfassung der Nährstoffaufnahme während der Studie

(EP: Ernährungsprotokoll, d: Tag, ↑ Untersuchungs-/Blutentnahmetermine)

Die Protokolle wurden mit dem Nährwertkalkulationsprogramm **PRODI**® 5 Expert ausgewertet. Dieses Programm schlüsselt die protokollierten Nahrungsmittel auf Basis der Ernährungsdatenbank NutriBase® nach ihrer Zusammensetzung (z.B. Kohlenhydraten, Fett, Eiweiß, Mineralstoffe, Vitamine) auf und berechnet den Nährwert. Für jeden Probanden wurde in jeder Studienphase die mittlere tägliche Nährstoffaufnahme berechnet und mit der Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr von Deutschland, Österreich und Schweiz (D-A-CH-Referenzwerte) nach PRODI® verglichen.

## **Biomarkeruntersuchungen**

Das in EDTA-Röhrchen gesammelte Blut wurde zwischen den Kooperationspartner aufgeteilt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Biomarker der oxidativen Zellschädigung (Comet Assay), des zellulären Oxidationsstatus (GSH-Status) und der Modulation der Zellantwort (tGSH-Level) bestimmt. Die Messungen erfolgten (außer bei der DNA-Schäden) nach Abschluss der Interventionsstudie probandenweise, d.h. eine Messung wurde pro Proband mit Proben aller vier Blutentnahme durchgeführt. Damit wurde gewährleistet, dass die methodischen Schwankungen der jeweiligen Bestimmungen in den Hintergrund tragen.

### **4.15 Statistik**

Die Messwerte sind als absolute Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

## **Signifikanzen**

Um die erhaltenen Messwerte statistisch einordnen zu können, werden Signifikanztests eingesetzt. Dabei werden mit Hilfe von formulierten Hypothesen Gleichheit bzw. Unterschiede oder Effekte innerhalb der Messreihe überprüft. Die Nullhypothese  $H_0$  ist zumeist die Formulierung der Gleichheit, die Gegenhypothese  $H_1$  die Formulierung eines Unterschieds oder Effekts. Die Hypothesen werden in der Regel zweiseitig formuliert (Gleichheit vs. positiver Effekt bzw. Gleichheit vs. negativer Effekt). Statistische Tests bedienen sich oft folgender Schlussweise: Zunächst wird eine Nullhypothese aufgestellt, mit dem Ziel, diese Hypothese zu verwerfen, um die Gegenhypothese annehmen zu können.

Signifikanztests sind nur dann einsetzbar, wenn die Hypothese vor Kenntnis der Daten aufgestellt wurde.

Die Wahl des Signifikanztests ist davon abhängig, ob sich die zu testende Hypothese auf eine Stichprobe bezieht, oder ob mehrere Stichproben verglichen werden sollen. Ebenso muss berücksichtigt werden, ob es sich beim Vergleich der Messwerte um abhängige oder unabhängige Stichproben handelt und welcher Verteilung die Daten unterliegen.

Das Ergebnis eines Signifikanztests wird häufig als p-Wert bezeichnet. Ist der p-Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau  $\alpha$  (häufig  $\alpha=0,05$ ) so wird die

Nullhypothese abgelehnt. Das Ergebnis gilt dann als statistisch signifikant [Lange, 2001].

### ***In vitro* Daten**

Zur Berechnung der signifikanten Abnahme der oxidativen Schädigung wurde der Einstichproben-t-Test (einseitig) angewendet. Dazu wurden die Differenzen zwischen Oxidans-Kontrolle und (Polyphenol+Oxidans)-Proben gemittelt und mit der Nullhypothese  $H_0=0$  verglichen. Bei Untersuchungen ohne Oxidansbehandlung erfolgte der Vergleich mittels unabhängigen STUDENT t-Test [Gottwald, 2000]. Ausreißer wurden mit Hilfe des NALIMOV-Tests ermittelt und nicht für die weiteren Berechnungen miteinbezogen.

#### **4.15.1 Ausreißer-Test (Nalimov)**

Bei Mehrfachbestimmungen der Messwerte wurde der Ausreißer-Test nach Nalimov durchgeführt. Geprüft wurde, ob die einzelnen Werte aufgrund ihrer hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung ausgenommen werden sollen. Für den Test müssen mindestens Daten aus 3 Bestimmungen ( $n > 2$ ) vorliegen. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und größten Wert, anschließend wird eine Prüfgröße PG nach der Formel berechnet (Gl. 4.1):

$$PG = \frac{|x^* - MW|}{s_x} * \sqrt{\frac{N}{N-1}} \quad (4.1)$$

$x^*$  = ausreißverdächtiger Wert

$\bar{x}$  = Mittelwert

$s_x$  = Standardabweichung

$N$  = Anzahl der Stichproben

Die errechnete Prüfgröße (PG) wird mit einem Tabellenwert (mit  $P = 95\%$ ) verglichen. Ist der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert, liegt nach Nalimov kein Ausreißer vor [Gottwald, 2000].

#### **4.15.2 Anderson-Darling Test**

Dieser Test prüft auf die Normalverteilung der Daten nach folgender Formel:

$$A^2 = -N - S$$

mit

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{(2i-1)}{N} [\ln F(Y_i) + \ln(1 - F(Y_{N+1-i}))]$$

F = Verteilungsfunktion

$Y_i$  = Daten

N = Stichprobenumfang

Waren die betrachteten Daten normalverteilt, so konnte als statistischer Test der STUDENT t-Test angewendet werden. In den Fällen, in denen sich keine Normalverteilung der Messwerte ergab, wurde der WILCOXON-Test angewendet.

#### **4.15.3 Parametrische Tests: t-Test**

Mit Hilfe der t-Test-Prozeduren können Aussagen über die Gleichheit bzw. Verschiedenheit einer oder mehreren Stichproben anhand der ihrer Mittelwerte oder deren Differenz getroffen werden. Die Mittelwerte aus Stichproben sind Schätzwerte für die entsprechenden Erwartungswerte der Grundgesamtheit. Es stehen verschiedene Prozeduren zur Durchführung eines t-Tests zur Verfügung:

##### **t-Test bei einer Stichprobe**

Mit dieser Prozedur kann anhand der Beobachtungen einer Stichprobe getestet werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Mittelwert einer beobachteten Variablen in der Grundgesamtheit einen vorgegebenen Wert über- oder unterschreitet.

##### **t-Test bei unabhängigen Stichproben**

Hierbei wird nicht ein Mittelwert daraufhin getestet, ob dieser einen bestimmten Wert erreicht, sondern er vergleicht zwei Mittelwerte miteinander und testet, ob diese in der Grundgesamtheit gleich groß sind. Diese Mittelwerte müssen aus zwei unabhängigen Stichproben stammen. Es werden also die Mittelwerte einer Variablen in zwei Fallgruppen miteinander verglichen.

##### **t-Test bei gepaarten Stichproben**

Dieser Test vergleicht ebenfalls zwei Mittelwerte miteinander, allerdings ist dieser Test darauf ausgerichtet, dass die Stichproben systematisch miteinander verbunden

sind. Hierbei werden die Mittelwerte zweier Variablen (derselben Fallgruppe) miteinander verglichen. Die allgemeine Formel (Gl. 4.2) für den t-Wert lautet:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{\sigma^2}{\sqrt{n}}} \quad (4.2)$$

$\bar{x}$  = Mittelwert 1

$\mu$  = Mittelwert 2

$\sigma^2$  = Varianz

n = Stichprobenumfang

Vorraussetzung für die Durchführung dieses t-Tests ist die Annahme einer Normalverteilung der zu betrachtenden Messwerte [Lange, 2001]. Im Fall der Normalverteilung wurden die Unterschiede der untersuchten Marker der Interventionsstudie zwischen „1. wash out Phase“ und Kaffeephase, Kaffeephase und „2. wash out Phase“ mit dem gepaarten einseitigen t-Test überprüft.

#### 4.15.4 Wilcoxon-Test

Da nach dem ANDERSON-DARLING-Test nicht alle Daten normalverteilt waren, musste für dieses Datenkollektiv ein anderer Signifikanztest eingesetzt werden. Der WILCOXON-Test für Paardifferenzen ist der optimale Test für den Vergleich zweier verbundener Stichproben bei nicht normalverteilten Differenzen [Sachs, 2003]. Dieser Test gestattet die Prüfung, ob die Differenzen paarig angeordneter Beobachtungen symmetrisch mit dem Median gleich Null verteilt sind und beruht somit ebenfalls auf dem Prinzip die Nullhypothese anzunehmen oder abzulehnen.

$$z = \frac{T - E(T)}{\sigma_T}$$

mit

$$E(T) = \frac{N(N+1)}{4}; \sigma_T^2 = \frac{N(N+1)(2N+1)}{24}$$

T = Summe der Ränge mit dem weniger häufigen Vorzeichen

N = Stichprobenumfang

#### 4.15.5 ANOVA

Als **Varianzanalyse** bezeichnet man eine große Gruppe datenanalytischer und mustererkennender statistischer Verfahren, die zahlreiche unterschiedliche Anwendungen zulassen. Ihnen gemeinsam ist, dass sie die Varianz analysieren, um Aufschlüsse über die hinter den Daten steckenden Gesetzmäßigkeiten zu erlangen. Die Varianzanalyse wird häufig auch als **ANOVA**, (**analysis of variance**) bezeichnet. Varianzanalysen erklären die Varianz einer metrischen Zufallsvariable durch den Einfluss einer oder mehrerer Gruppenvariablen. Stets wird eine Prüfgröße berechnet. Für die Interpretation der Ergebnisse wurden die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA, Gl. 4.3) und die dreifaktorielle Varianzanalyse (three-way ANOVA, ohne Berücksichtigung von Interaktionen, Gl. 4.4) genutzt. Untersucht wurden die Einflüsse der unterschiedlichen Lebensweise der einzelnen Probanden und der Studienphasen (two-way ANOVA) sowie des Body-Mass-Index und Alter auf die verschiedenen Biomarker (three-way ANOVA).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + Z_{ijk}, i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k \geq 1 \quad (4.3)$$

$Y_{ijk}$ : Zielvariable; annahmegemäß in den Gruppen normalverteilt

$i$ : Anzahl der Faktorstufen des ersten Faktors (A)

$j$ : Anzahl der Faktorstufen des zweiten Faktors (B)

$k$  : Anzahl der Beobachtungen pro Faktorstufe (hier für alle Kombinationen von Faktorstufen gleich)

$\alpha_i$ : Effekt der  $i$ -ten Faktorstufe des Faktors A

$\beta_j$ : Effekt der  $j$ -ten Faktorstufe des Faktors B

$Z_{ijk}$  : Interaktion (Wechselwirkung) der Faktoren auf der Faktorstufenkombination  $(i,j)$ .

Die Interaktion beschreibt einen besonderen Effekt, der nur auftritt, wenn die Faktorstufenkombination  $(i,j)$  vorliegt.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + Z_{ijkl}, \quad (4.4)$$

$i = 1, \dots, I, j = 1, \dots, J, k = 1, \dots, K, l \geq 1$

$Y_{ijkl}$ : Zielvariable; annahmegemäß in den Gruppen normalverteilt

$i$ : Anzahl der Faktorstufen des ersten Faktors (A)

$j$ : Anzahl der Faktorstufen des zweiten Faktors (B)

$k$ : Anzahl der Faktorstufen des dritten Faktors (C)

$I$  : Anzahl der Beobachtungen pro Faktorstufe

$\alpha_i$ : Effekt der  $i$ -ten Faktorstufe des Faktors A

$\beta_j$ : Effekt der  $j$ -ten Faktorstufe des Faktors B

$\gamma_k$ : Effekt der  $k$ -ten Faktorstufe des Faktors C

$Z_{ijkl}$  : Interaktion der Faktoren auf der Faktorstufenkombination  $(i,j,k)$ . Die Interaktion beschreibt einen besonderen Effekt, der nur auftritt, wenn die Faktorstufenkombination  $(i,j,k)$  vorliegt.

## 5. Ergebnisse und erste Diskussion

### 5.1 *in vitro* Untersuchungen

Die ***in vitro* Arbeiten** hatten das Ziel, die antioxidative Wirksamkeit ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe (Leitsubstanzen) und Kaffeeextrakte zu charakterisieren. Neben der direkten (zellfreien) antioxidativen Aktivität wurden oxidative Zellschädigung und Zellantwort erfasst. Als Zellsysteme wurden die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und Caco-2 ausgewählt, da diese sich bereits als geeignet zur Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit von Polyphenolen erwiesen haben [Schaefer *et al.*, 2006a]. Bereits in früheren Arbeiten der AG wurde eine unterschiedliche Sensitivität der in der Arbeit verwendeten Zellen beobachtet. Dieser Unterschied stützt die Notwendigkeit für die Bewertung der präventiven Wirksamkeit die Ergebnisse verschiedener Zelllinien heranzuziehen. Die Verwendung verschiedener Zellsysteme ermöglicht zudem eine zuverlässigere Aussage über die biologische Wirksamkeit der Antioxidantien im Hinblick auf die Übertragung auf das *in vivo* System.

Erfasst wurde in einem zellfreien System das antioxidative Potential (TEAC, ORAC) der Kaffeeinhaltsstoffe /-extrakte, in Zellkultur die Veränderungen des ROS-Levels (DCF-Assay, in HT-29 Zellen), Modulation (oxidativer) DNA-Schädigung (Comet Assay, Caco-2 Zellen) und ARE-abhängiger Enzyme (Western Blot, HT-29 Zellen). Da eine Modulation des geringen zellulären Basisschadens (DNA-Schäden, ROS-Level) nur schwer quantifizierbar war, wurde nach Vorinkubation mit den potenziellen Antioxidantien eine Oxidansbehandlung zur Erhöhung des Schädigungsausmaßes durchgeführt. Durch eine nachgeschaltete Oxidansbehandlung werden nur zellvermittelte Effekte erfasst, mögliche Interaktionen zwischen Kaffeeinhaltsstoffen und Oxidans im Medium, die bei einer Co-inkubation auftreten könnten, werden so umgangen [Schaefer *et al.*, 2006b]. Als Oxidanzien wurde Menadion (Comet Assay) und *tert*-Butylhydroperoxid (TBH) (DCF-Assay) verwendet.

#### 5.1.1 Zellfreie antioxidative Aktivität der Kaffeeextrakte und Inhaltsstoffe

Die zellfreie antioxidative Aktivität der Kaffeeinhaltsstoffe/-extrakte wurde in zwei standardisierten photometrischen Testverfahren (**TEAC**, trolox equivalent antioxidant capacity, **ORAC**, Oxygen radical absorbing capacity,) erfasst (s. 3.7.8.1/3.7.8.2). Da



ihre Reaktionen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen (ORAC: Wasserstoff-Atom-Transfer HAT; TEAC: überwiegend Ein Elektronentransfer, SET) erlaubt die Messung beider Assays eine umfassendere Beurteilung der radikalabfangenden Eigenschaften der Kaffeeinhaltsstoffe und –extrakte.

Die Konzentrationen ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe (in den Extrakten) und die zellfreie antioxidative Aktivität der untersuchten Kaffeeextrakte sind in Tabelle 5-1 dargestellt.

**Tabelle 5-1: Zusammensetzung und zellfreie antioxidative Aktivität (TEAC, ORAC) der Extrakte**

		<b>RI</b>	<b>AC</b>	<b>AB</b>	<b>AB 1</b>	<b>AB 2</b>
<b>TEAC</b> <sup>a</sup>	mM Trolox	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>ORAC</b> <sup>a</sup>	mM Trolox	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,1
<b>Kaffeeinhaltsstoffe</b>						
5-CQA	mg/g*	33,4	41,6	39,2	58,3	5,4
4-CQA	mg/g*	19,3	20,2	20,5	30,3	3,6
3-CQA	mg/g*	16,6	17	17,3	25,8	3,1
Σ-CQA	mg/g*	69,3	78,8	77	114,3	12,1
Catechol	mg/g *	n.n	n.n	n.n	0,13	1,3
Trigonellin	mg/g*	n.n	n.n	n.n	31,6	6,3
NMP	mg/g*	1,5	1,2	1,5	0,4	4,8

\* Berechnet aus Stoffkonzentration im Kaffeegetränk (mg/l) und Extraktausbeute (g/l Kaffeegetränk), Daten erhalten von AG Hofmann;

<sup>a</sup> Die Konzentration einer Trolox-Lösung [mM], die die gleiche antioxidative Kapazität aufweist wie eine Lösung der Konzentration 1 mg/ml Testsubstanz: n=3, Mittelwerte und SD; n.n- nicht Nachweisbar; CQA: Caffeoylchinasäure;

Der Vergleich der Analysedaten der Extrakte zeigt eine deutliche Abhängigkeit von Röstgrad. Die mittelstark gerösteten Kaffeeextrakte RI, AC und AB wiesen ziemlich ähnliche Konzentration an CQAs (69-97 mg/g) und NMP (1,2-1,5 mg/g) auf. Da die Konzentrationen der CQAs durch thermischen Abbau reduziert wurden, zeigte stark gerösteter Arabica Brazil Extrakt 2 (AB 2) deutlich niedrigere Anteil an CQAs als der leicht geröstete AB 1. Dementsprechend wurde die Konzentration des phenolischen Abbauproduktes Catechol um den Faktor 10 erhöht. Der im Kaffee natürlich vorkommende Inhaltsstoff Trigonellin wurde während des Röstens durch

Decarboxylierung am stärksten abgebaut und kam in AB 2 in niedrigeren Konzentrationen vor. Im Gegensatz dazu war die Konzentration der Trigonelin-Abbauprodukt NMP in AB 2 erhöht.

Eine deutliche antioxidative Aktivität (bezogen auf 1 mg/ml Extrakt) wurde für alle getesteten Kaffeeextrakte mit TEAC und ORAC Werten von 0,9-1,5 bzw. 2,5-2,8 mM Trolox beobachtet (Tabelle 5-1). Der ORAC Assay zeigte keine Rangordnung der Wirkungsstärke der leicht-, mittel- und starkgerösteten Extrakte. Der TEAC Assay zeigte dagegen leicht höhere Werte für die mittel gerösteten Extrakte im Vergleich zu den leicht- bzw. starkgerösteten (AB 1 und AB 2):

$$AC > AB/RI > AB\ 1/AB\ 2$$

Die lineare Regressionsanalyse (Tabelle 5-2) zeigte einen schwachen, positiven Zusammenhang zwischen CQA Konzentration und antioxidativer Aktivität der Extrakte. Für NMP dagegen wurde eine negative Korrelation festgestellt ( $R = -0,391$  bzw.  $-0,383$ ).

**Tabelle 5-2: Korrelationskoeffizienten R der linearen Regression**

Kaffeinhaltstoffe	R	
	TEAC	ORAC
5-CQA	0,203	0,233
4-CQA	0,171	0,324
3-CQA	0,161	0,339
$\Sigma$ -CQA	0,186	0,286
NMP	-0,392	-0,383

Die antioxidative Aktivität der untersuchten phenolischen- und pyridinium-Kaffeinhaltstoffen ist in Tabelle 5-3 dargestellt. Die TEAC/ORAC Werte von 5-CQA und CA waren deutlich höher als die der phenolischen Abbauprodukte Cat und THB und stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein [Gomez-Ruiz *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2006a]. CAT zeigte höhere Peroxylradikal-abfangende Kapazität (ORAC), THB dagegen reduzierte mehr das ABTS Radikal (TEAC). Die Alkylpyridinium-Verbindungen (Trigonellin und NMP) zeigten eine geringere (TEAC) bzw. keine direkte antioxidative Aktivität (ORAC). Für TRIG wurde in der Literatur bereits eine geringere Radikal-abfangende Eigenschaft gegenüber 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)- Radikal, bestimmt anhand Elektronenspinresonanz-Analyse, beschrieben; eine Wirkung gegenüber OH- Radikalen war nicht nachweisbar [Ogata *et al.*, 2002]. Struktur-Wirkungsuntersuchungen mit Niacin-verwandten Verbindungen

geben Hinweise, dass die Resonanzstruktur des Pyridinringes wichtig für radikalabfangenden Eigenschaften ist [Ogata *et al.*, 2002].

**Tabelle 5-3: TEAC- und ORAC-Werte von Kaffeeinhaltsstoffen**

Kaffeeinhaltsstoffe	TEAC [mM Trolox]		ORAC [mM Trolox]	
	1 mM <sup>[a]</sup>	1 mg/ml <sup>[b]</sup>	1 mM <sup>[a]</sup>	1 mg/ml <sup>[b]</sup>
Chlorogensäure (5-CQA)	1,3 ± 0,05	3,6	3.50 ± 0,07	9,9
Kaffeesäure (CA)	1,3 ± 0,2	6,9	3,9 ± 0,17	21,6
Catechol (CAT)	0,9 ± 0,02	8,1	3,36 ± 0,06	30,5
1,2,4-Trihydroxybenzol (THB)	1,1 ± 0,02	8,4	1,84 ± 0,16	14,5
Trigonellin (TRIG)	0,5 ± 0,03	2,6	n.n	
N-Methylpyridinium (NMP)	0,4 ± 0,03	1,8	n.n	
N-Methyl-2-Methylpyridinium-Iodid	n.n	n.n	n.n	
N-Methyl-3-Methylpyridinium-Iodid	n.n	n.n	n.n	

<sup>[a]</sup>, <sup>[b]</sup> Die Konzentration einer Trolox-Lösung [mM], die die gleiche antioxidative Kapazität aufweist wie eine Lösung der Konzentration [a] 1 mM bzw. [b] 1 mg/ml der Testsubstanz; n=3, Mittelwerte und SD; n.n- nicht nachweisbar

Auf der Basis der TEAC/ORAC - Werte der Kaffeeinhaltsstoffe (bezogen auf 1mg/ml, Tabelle 5-2) und ihren Konzentrationen in den Extrakten (Tabelle 5-1) wurde ihr Anteil an der antioxidativen Aktivität der Extrakte berechnet: 5-CQA trägt maximal 22 % und TRIG max. 8% zur antioxidativen Kapazität des leicht gerösteten AB 1 Extrakts bei; andere Chlorogensäure Verbindungen (z.B. dicaffeoylchinasäuren) sowie 3 und 4-CQA Isomere leisten ebenfalls einen Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit dieses Extrakts. Für die Röstprodukte NMP und CAT, die in höheren Konzentration in AB 2 vorkommen, wurde kein Beitrag sowohl in AB 1 als auch in AB 2 gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die direkte antioxidative Kapazität der Extrakte maßgeblich durch andere während des Kaffeeröstens gebildete Verbindungen wie Melanoidine und andere Maillard- Reaktions Produkte bestimmt wird [del Castillo *et al.*, 2002].

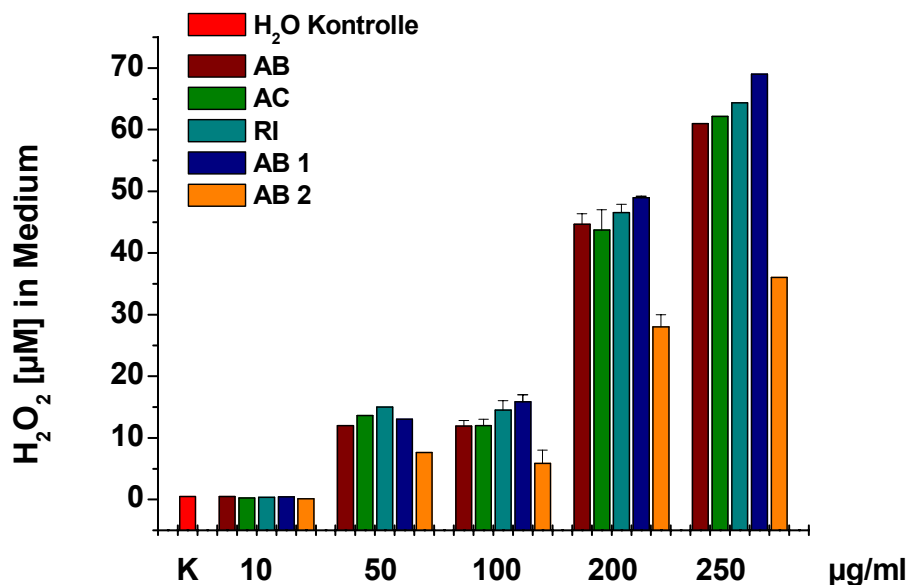
### **5.1.2 Prüfung auf extrazelluläre Generierung von Wasserstoffperoxid und dessen Einfluss auf den zellulären ROS-Level**

Phenolische Verbindungen besitzen reaktive funktionelle Gruppen, so dass nicht nur antioxidative und protektive, sondern auch adverse Effekte zu erwarten sind. Die Anwesenheit von Übergangsmetallionen und wässriges Milieu begünstigen die prooxidative Wirkung, außerdem spielt der pH-Wert eine große Rolle [Canada *et al.*, 1990; Lapidot *et al.*, 2002b]. Viele Arbeiten belegen, dass polyphenolische Bestandteile mit allgemein verwendeten Zellkulturmedien wie DMEM interagieren und dadurch  $\text{H}_2\text{O}_2$  generieren können [Long and Halliwell, 2001]. Wasserstoffperoxid zeigt vielfältige biologische Wirkungen und nimmt Einfluss auf zelluläre Mechanismen (z.B. Transkription, Genexpression). Daher war es notwendig, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung durch die zu untersuchenden Kaffeeinhaltsstoffe und –Extrakte während der Inkubation im Zellkulturmedium zu erfassen.

Ziel dieser Untersuchungen war die Abschätzung der Übertragbarkeit des *in vitro* Models auf die *in vivo* Situation, da diese prooxidativen Effekte im Menschen bislang nicht nachgewiesen werden konnten [Halliwell, 2008].

Untersucht wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung in Zellkulturmedien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sowie DMEM/F12, eine 1:1 Mischung aus DMEM mit Ham's Nutrition Mix F12. Diese beiden Medien werden in unserer Arbeitsgruppe zur Kultivierung der Darmkrebszelllinien HT-29 (DMEM) und Caco-2 (DMEM/F12) verwendet. Die Inkubation erfolgte mit den Kaffeeextrakten/-inhaltsstoffen, wie für die meisten untersuchten Endpunkte dieser Arbeit üblich, für 24h im Brutschrank (37°C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit, 5 %  $\text{CO}_2$ ).

In DMEM wurde eine deutliche, konzentrationsabhängige  $\text{H}_2\text{O}_2$  Bildung durch die leicht und mittel geröstete Kaffeeextrakte (AB 1, AB, AC, RI) beobachtet, die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung durch den stark geröstete AB 2 war dagegen deutlich niedriger (Abbildung 5-1). Von den untersuchten Kaffeeinhaltsstoffen (1-100  $\mu\text{M}$ ) zeigten Alkylpyridinium Verbindungen (TRIG, NMP, NM-2MP, NM-3MP) und Hydroxybenzole (CAT, THB) im Gegensatz zu 5-CQA und CA keine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung. Letztere wurden von Bellion *et al.* als deutliche Prooxidantien in DMEM identifiziert [Bellion *et al.*, 2009].



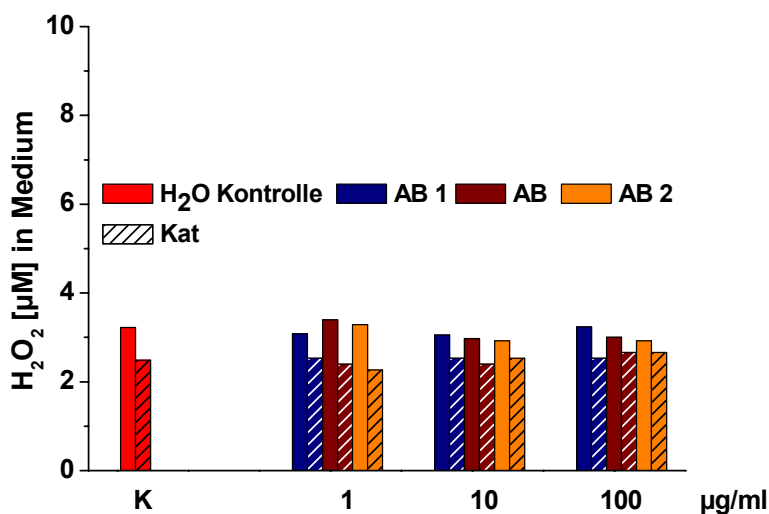
**Abbildung 5-1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in Medium für HT-29-Zellen (DMEM + 5% FKS + 1% Penicillin/ Streptomycin; zellfrei) nach 24h Inkubation mit Kaffeeextrakten. (n=1-2, Vierfachbestimmung: Mittelwert)**

Die beobachtete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildung in DMEM ist in erster Linie stark vom pH Wert des Mediums abhängig, da ein hoher pH  $\geq 7$  prooxidative Eigenschaften der phenolischen Verbindungen ermöglicht (durch leichte Deprotonierung zum Phenolat-Anion) [Bellion *et al.*, 2009]. Begünstigt wird die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generierung durch die phenolischen Verbindungen, die eine *o*-Catechol oder Pyrogallol Struktur besitzen (Catechol < Pyrogallol) [Miura *et al.*, 1998]. Im Gegensatz zu 5-CQA und CA zeigten CAT und THB keine Wirkung in DMEM (Bicarbonat-Puffer) bzw. schwache H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generierung in Acetat-Puffer [Miura *et al.*, 1998] Diese Unterschiede unterstreichen die Bedeutung von Seitenketten der phenolischen Struktur.

Um im Medium gebildetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abzubauen, wurden Prüfsubstanzinkubationen mit Zusatz von dem antioxidativ wirksamen Enzym Katalase (Kat 100 U/ml) durchgeführt. Kat ist in der Lage erhöhte Level an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Medium durch Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Sauerstoff und Wasser abzufangen [Nakagawa *et al.*, 1965; Veeriah *et al.*, 2006]. Durch Zugabe von Kat ins DMEMMedium konnte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration nach 24h- Inkubation mit Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten vermindert werden und lag im Bereich der Lösungsmittelkontrolle. Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit und ohne Katalase (100 U/ml) erhalten wurden, sollte aufklären ob eine

„artifizielle“  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung unter den gewählten Inkubationsbedingungen stattfindet.

In DMEM/F12 (verwendet für die Kultivierung von Caco-2 Zellen) wurde nach 24 h Inkubation mit Kaffeeextrakten keine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung beobachtet (Abbildung 5-2) bzw. die Werte lagen unter der Lösungsmittelkontrolle ( $< 2,5 \mu\text{mol/l}$ ). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Bellion *et al.* überein, die nach Inkubation von Apfelsaftextrakten sowie –inhaltsstoffen keine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Bildung in DMEM/F12 feststellen konnten [Bellion *et al.*, 2009]. Ähnliche Beobachtungen wurde von Long *et al.* beschrieben [Long *et al.*, 2007]. Dies kann einerseits durch Anwesenheit des Radikalfänger Pyruvat im Medium zu erklären werden [Babich *et al.*, 2009; Long and Halliwell, 2009]; ebenso diskutiert wird die Verwendung von HEPES Puffer, der eine Absenkung des pH-Wertes ( $\text{pH} \leq 7,2$ ) verhindert [Bellion *et al.*, 2009]. Da keine Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Inkubationsmedium DMEM/F12 (DMEM mit Ham's Nutrition Mix F12.) feststellbar war, wurden weitere Untersuchungen mit Caco-2 Zellen in Abwesenheit von Katalase durchgeführt.



**Abbildung 5-2:**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Medium für Caco-2 Zellen (DMEM/F12 + 10% FKS + 1% Penicillin/ Streptomycin; zellfrei) nach 24h Inkubation mit Kaffeeextrakten mit/ohne Zugabe von 100 U/ml Kat. ( $n=1$ , Doppelbestimmung)

Die bisher vorgestellten Untersuchungen wurden im zellfreien System durchgeführt. Weiterhin wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Generierung im Medium mit Prüfsubstanzen in Anwesenheit von HT-29 Zellen entsprechend dem Standardprotokoll geprüft. In Gegenwart von HT-29 Zellen (24 h Inkubation mit allen Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten) lag die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration im Medium stets im Bereich der

Lösungsmittelkontrolle (Inkubation ohne/mit Katalase). Dies könnte auf einen Abbau von entstehendem  $H_2O_2$  durch antioxidative Enzyme der Zellen zurückzuführen sein [Lapidot *et al.*, 2002a].

Ob in DMEM generiertes  $H_2O_2$  den TBH-induzierten ROS-Level in HT-29 Zellen beeinflussen kann wurde durch Inkubation (mit/ohne 100 U/ml Kat) mit den Kaffeeextrakten AB, AC und RI ermittelt. Der ROS-Level wurde durch Inkubation mit Kaffeeextrakten (1-250  $\mu\text{g/ml}$ ) ab 50  $\mu\text{g/ml}$  vermindert, wobei sich bei Inkubation mit/ohne KAT keine signifikanten Unterschiede zeigten (Abbildung 5-3). Daher kann vermutet werden, dass die Reduktion des zellulären ROS-Levels auf der Wirkung der Kaffeeextrakte beruht; somit scheint unter diesen Bedingungen  $H_2O_2$  keine Bedeutung zu haben.

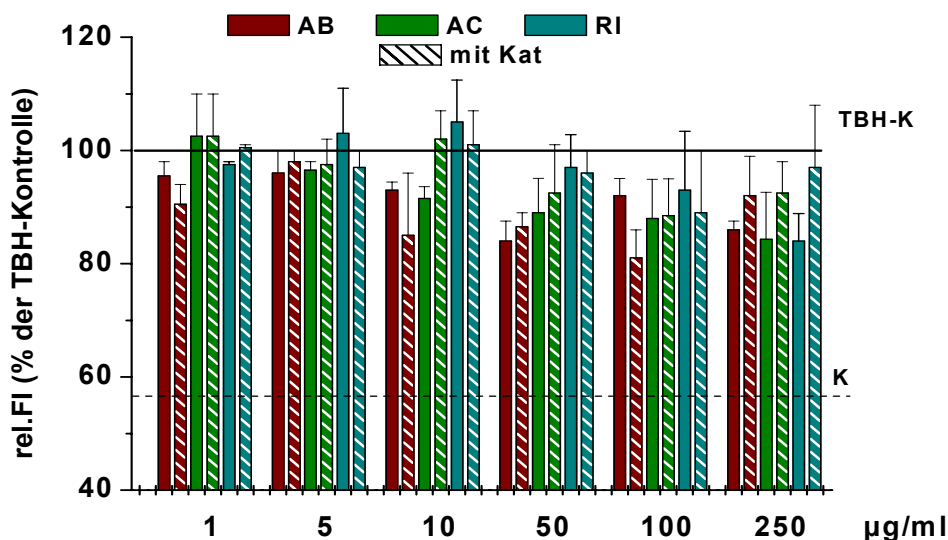
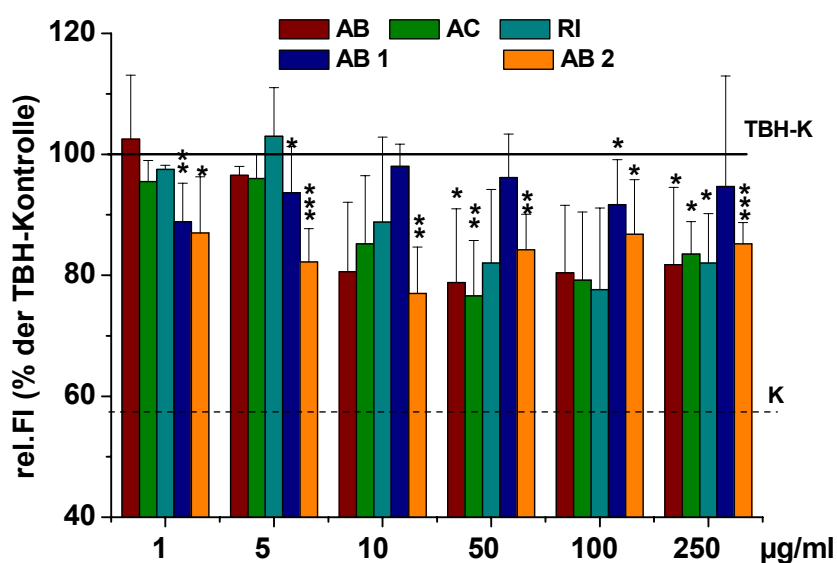


Abbildung 5-3: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit den Kaffeeextrakten AB, AC, RI; mit /ohne Katalase; n=1-3, Vierfachbestimmung: Mittelwert und SD

### 5.1.3 Modulation TBH-Induzierten ROS-Level

Beim Dichlorfluorescein-(DCF)-Assay werden hauptsächlich ROS erfasst, die sich im Zytoplasma befinden (s. 3.7.5). Die Beeinflussung des Redoxstatus von HT-29 Zellen durch Kaffeeextrakte und –inhaltsstoffe wurde mit dem Oxidants *tert*-Butylhydroperoxid (TBH, 250  $\mu\text{M}$ ) untersucht. TBH wurde eingesetzt, da es sich in früheren Untersuchungen als geeignet erwiesen hatte, den intrazellulären ROS-Level konzentrationsabhängig zu erhöhen [Schaefer *et al.*, 2006a].

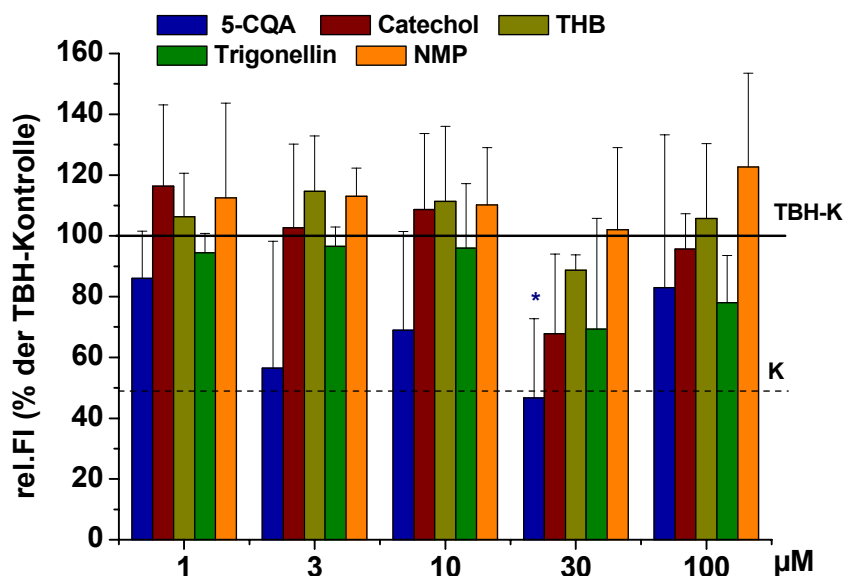
Untersucht wurde die Modulation des zellulären ROS-Levels in HT-29-Zellen nach 24 h Inkubation mit Kaffeeextrakten und -inhaltsstoffen (Abbildung 5-4). Durch den leicht gerösteten AB 1 Extrakt (1-250 µg/ml) wurde eine leichte Abnahme des ROS-Levels hervorgerufen. Die mittelstark gerösteten AB, AC und RI zeigten eine deutliche, signifikante Reduktion des ROS-Levels bereits ab  $\geq 10$  µg/ml. Die beste Wirkung zeigte der stark geröstete AB 2, welcher über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 250 µg/ml den ROS-Level signifikant senkte (auf 77 % der TBH-Kontrolle, 10 µg/ml AB 2).



**Abbildung 5-4: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29-Zellen durch Inkubation mit Kaffeeextrakten (n=5, Mittelwert und SD); Signifikanz: \*\*p<0,01, \* p<0,05**

Die Ergebnisse zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen dem antioxidativen Potential der Extrakte und dem Röstgrad des Kaffees. Um abschätzen zu können welche Kaffeeinhaltsstoffe zur antioxidativen Wirksamkeit der Extrakte beitragen, wurden sie vergleichend geprüft (Abbildung 5-5). Die Ergebnisse zeigen, in Übereinstimmung mit der Literatur [Schaefer *et al.*, 2006a], eine 50 % Abnahme des zellulären ROS-Levels durch die Referenzverbindung 5-CQA (3 – 30 µM). Von den anderen untersuchten Inhaltsstoffen reduzierten Cat, THB und TRIG den zellulären ROS-Level erst bei höherer Konzentration ( $\geq 30$  µM); NMP dagegen zeigte keine antioxidative Wirkung.





**Abbildung 5-5: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29-Zellen durch Inkubation mit 5-CQA, NMP und Trigonellin (n=3-5, Mittelwert und SD); Signifikanz: \*  $p < 0,05$**

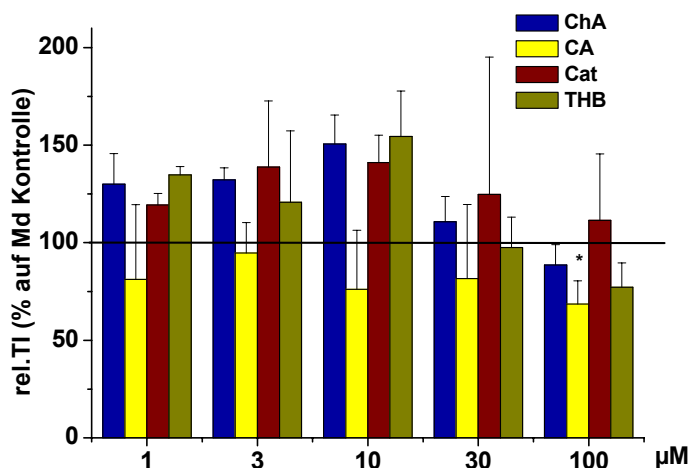
Unter Berücksichtigung der Konzentrationen dieser Verbindungen in den Extrakten wurde ihr Beitrag zur Reduktion des ROS-Levels abgeschätzt. AB 1, der die höchste Konzentration von 5-CQA aufweist, reduzierte leicht aber signifikant den ROS-Level bei der Konzentration 100 µg/ml. Da die Konzentration von 5-CQA in einer Lösung von 100 µg/ml AB 1 16,3 µM entspricht und im effektivsten Konzentrationsbereich (10-30 µM 5-CQA, Abbildung 5-5) liegt, konnte vermutet werden, dass die CQAs sowie andere Chlorogensäure Verbindungen zur beobachteten antioxidativen Wirksamkeit der AB 1 beitragen. Trigonellin, das eine leichte protektive Wirkung bei den 30-100 µM Konzentrationen zeigte, leistete für AB 1 keinen Beitrag. Im Falle von wesentlich stärker gerösteten Extrakten (AB, AC, RI und AB 2) ist ein derartiger Einfluss von Chlorogensäuren und Trigonellin eher unwahrscheinlich. Eine Lösung von 100 µg/ml AB 2 entsprach maximal 2,2 µM NMP. Da NMP über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich (1-100 µM) unwirksam war, scheint es keinen Einfluss zur erfassten Reduktion der ROS-Levels der mittel und stark gerösteten Extrakte zu haben.

#### **5.1.4 Modulation von oxidativen DNA-Schäden**

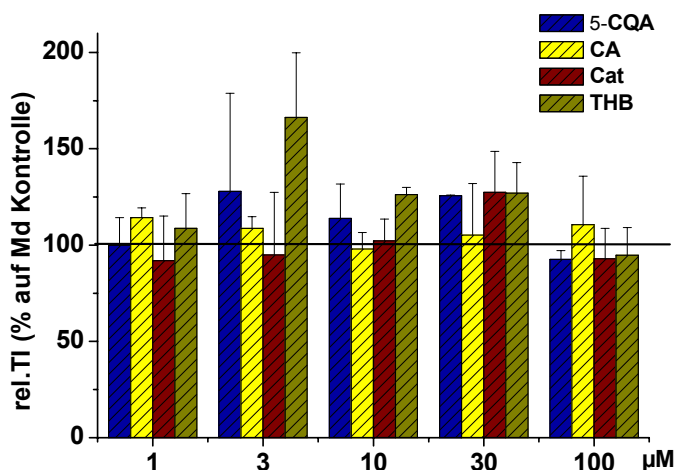
Die Modulation Md-Induzierter (oxidativer) DNA-Schädigung wurde in Caco-2-Zellen nach 24 h Inkubation mit Kaffeeinhaltsstoffen (1-100  $\mu$ M) mittels Comet Assay (s. 3.7.3) erfasst. Neben den Md-induzierten DNA-Strangbrüchen wurde auch die Modulation der Gesamt-DNA-Schäden (Strangbrüche + oxidative DNA-Modifikationen) untersucht. Durch Vorbehandlung mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) können zusätzlich zu DNA-Strangbrüchen spezifisch oxidative Schäden (oxidierte DNA-Basen sowie abasische DNA-Stellen) detektiert werden.

Die durch 5-CQA und seine Abbauprodukte erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-6 im Vergleich zur Md-behandelten Kontrolle (= 100 %) dargestellt. CA verringerte DNA-Strangbrüche in allen geprüften Konzentrationsbereichen, bei 100  $\mu$ molarer Konzentration war die Abnahme signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten 5-CQA und THB nur bei 100  $\mu$ M eine leichte Reduktion der Strangbrüche; Cat erwies sich als nicht antioxidativ wirksam. Die Betrachtung der Ergebnisse der Gesamt-DNA-Schäden zeigte für 5-CQA und seine Abbauprodukte keine signifikante Verringerung der Schäden. Die beobachtete CA induzierte Abnahme der (oxidativen) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen ist in der Literatur beschrieben [Schaefer *et al.*, 2006a].

a)



b)

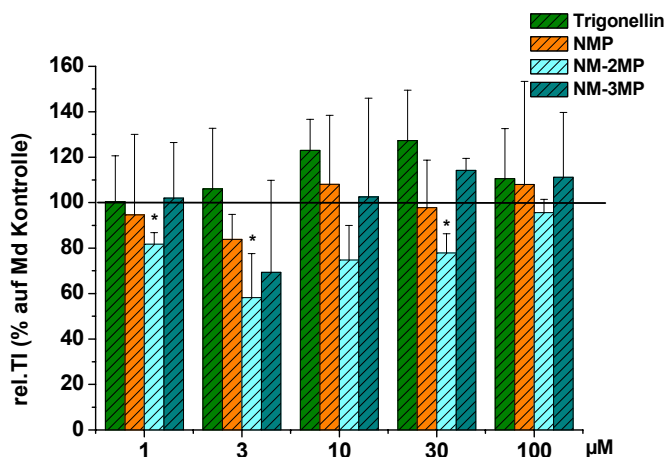


**Abbildung 5-6: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche (a) und Gesamt-DNA- Schäden (b) durch 24 h Inkubation mit 5-CQA, CA, Cat und THB. Mittelwert und SD aus n=3 unabhängigen Experimenten. Signifikanz: \*p<0,05**

Die Modulation der DNA-Strangbrüche durch Pyridiniumverbindungen des Kaffees ist in Abbildung 5-7 dargestellt. Trigonellin und NMP bewirkten im geprüften Konzentrationsbereich (1-100 µM) keine Modulation von DNA-Strangbrüchen und Gesamtschäden; Die methylierten NMP-Analoga NM-2MP und NM-3MP waren dagegen antioxidativ wirksam: NM-2MP zeigte eine deutliche Abnahme der Strangbrüche ab der Konzentration 3 µM. Bei 10 und 30 µM NM-2MP war der Effekt signifikant. Ebenfalls signifikante Reduktion wurde durch NM-3MP bei den Konzentrationen 3 und 30 µM beobachtet. Bei der Betrachtung vom Gesamt-DNA-Schäden zeigte NM-2MP eine U-förmige Konzentrations-Wirkungskurve (Abbildung

5-7) Die optimalen Wirkkonzentrationen lagen zwischen 1-30  $\mu\text{M}$ . Anders als bei den Versuchen ohne FPG war hier die antioxidative Wirksamkeit der NM-3MP weniger ausgeprägt.

a)



b)

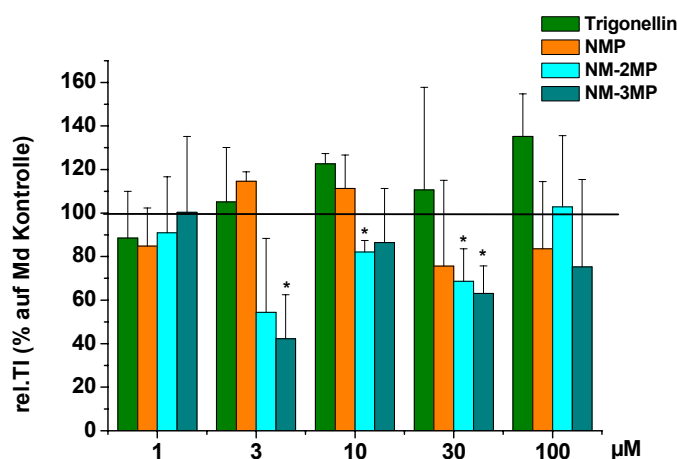


Abbildung 5-7: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche (a) und Gesamt-DNA- Schäden (b) durch 24h Inkubation mit Trigonellin, NMP, NM-2MP und NM-3MP. Mittelwert und SD aus n=3 unabhängigen Experimenten. Signifikanz: \*p<0,05

### 5.1.5 Expression ARE-abhängiger Enzyme

Die Modulation der ARE-abhängigen Enzyme NAD(P)H-Chinon-oxidoreduktase 1(NQO1, 30 kDa),  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL, 73 kDa) und Glutathionreduktase (GSR, 64 kDa) in HT-29 Zellen wurde nach 24 h Inkubation mit den Kaffeeextrakten AB 1 und AB 2 sowie deren Leitverbindungen 5-CQA und NMP über Western Blot geprüft. Die Etablierung der Methode in HT-29 Zellen wurde in

der Arbeit am Beispiel NQO1 dargestellt.

### NQO1 Proteinexpression

Um die NQO1-Basisexpression zu bestimmen wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen (10/15/30/45/60 µg Protein pro Geltasche) für die SDS-Page ausgewählt. Als Interne Beladungskontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin (55 kDa) gewählt, da sich dessen Molekulargewicht ausreichend von NQO1 unterscheidet. Die Western Blot-Analyse (Abbildung 5-8) zeigte konzentrationsabhängige Expression der NQO1 und  $\alpha$ -Tubulin in HT-29 Zellen. Die lineare Regressionsanalyse zeigte für die untersuchten Zielgene bzw. die Beladungskontrolle eine direkte Korrelation von Chemolumineszenzintensität (CI) und der Proteinkonzentration. Der Korrelationskoeffizient (R) betrug  $R = 0.954$  (NQO1) und  $R = 0.887$  ( $\alpha$ -Tubulin).

### Western Blot

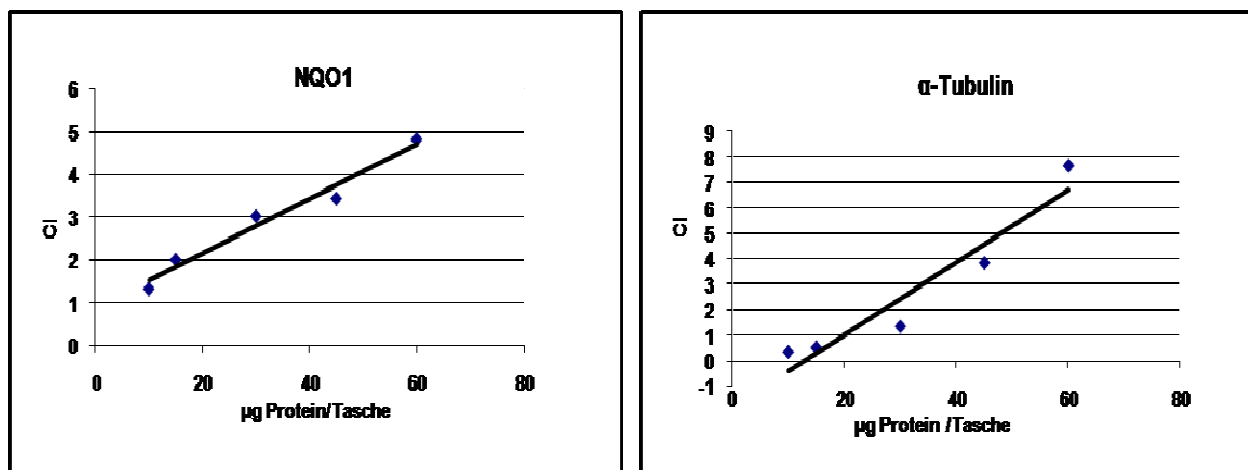
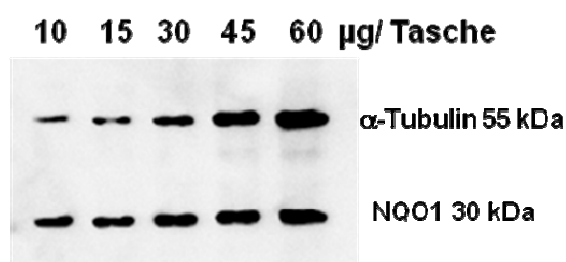


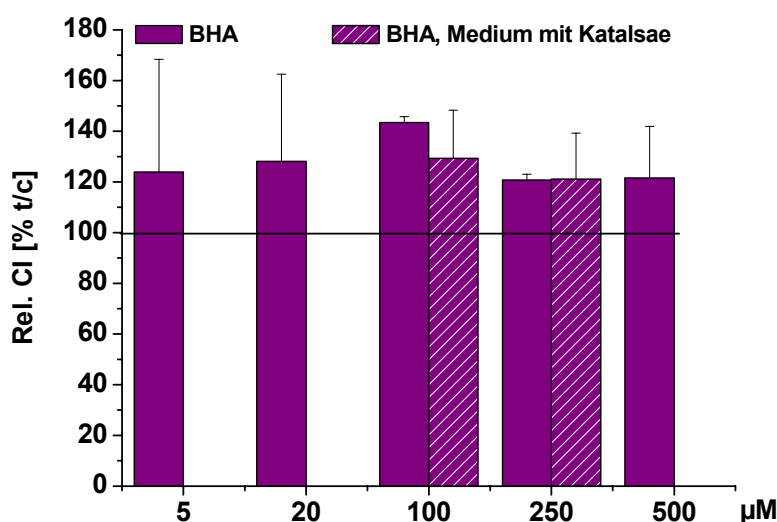
Abbildung 5-8: Korrelation zwischen CI der NQO1 (a) bzw.  $\alpha$ -Tubulin (b), HT-29 Zellen

Anhand der Ergebnisse wurde eine Proteinkonzentration von 30 µg/Geltasche als optimale Konzentration für NQO1 Expression in HT-29 Zellen ausgewählt. Die Modulation der NQO1 Expression durch Kaffeeextrakte und -inhaltsstoffe wurde in HT-29 Zellen im Vergleich zur Referenzsubstanz Butylhydroxyanisol (BHA) durchgeführt, welche als Induktor für NQO1 beschrieben ist [Keum *et al.*, 2006]. In

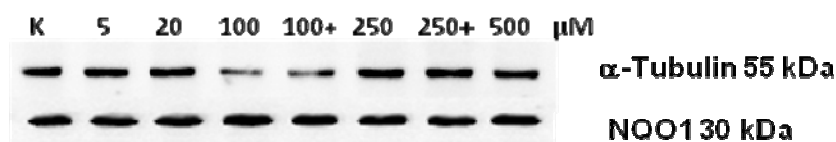
Anlehnung an die genannten Versuchsbedingungen wurden die Zellen 6 h mit 5-500  $\mu\text{M}$  BHA ohne Katalase inkubiert. Ergänzend wurden Inkubationen mit 100 und 250  $\mu\text{M}$  unter Zusatz von Katalase durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten für BHA in Analogie zur Literatur eine Steigerung der NQO1-Expression (Abbildung 5-9). Bei den Konzentrationen 100 und 250  $\mu\text{M}$  wurde eine Erhöhung auf 140 bzw. 120% der Kontrolle beobachtet, die durch Zugabe von Katalase praktisch verändert blieb.

a)

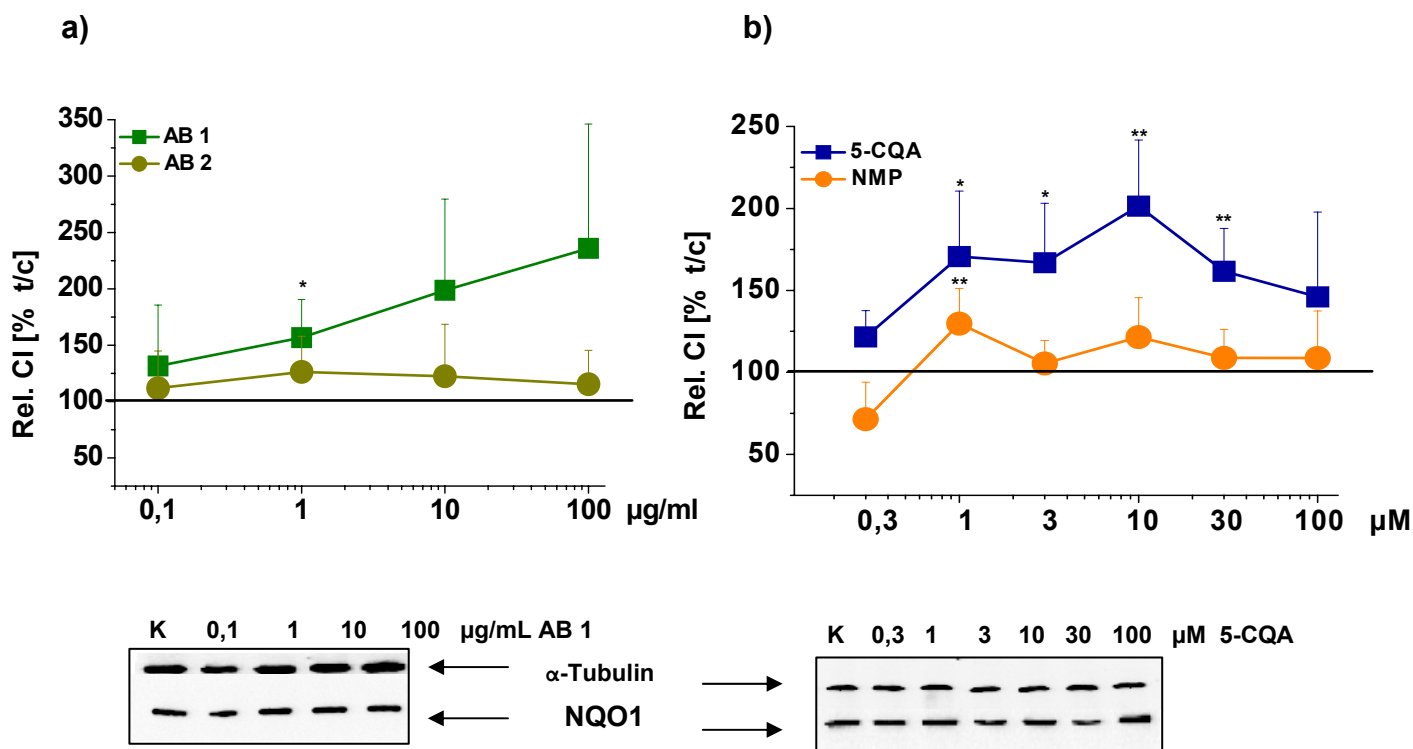


b)



**Abbildung 5-9:** a) Modulation der NQO1- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 6h-Inkubation mit BHA; n=2, Mittelwert und SD; Primär-Antikörper: mouse monoclonal-anti-NQO1 (1:2000); Sekundär-Antikörper goat-anti-mouse (1:1000) b) Western Blots: BHA 5 - 500 $\mu\text{M}$ . Beladungskontrolle  $\alpha$ -Tubulin; += Medium mit Katalase

Die Modulation der NQO1 Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24 h Inkubation mit AB 1 und AB 2 (0,1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) ist im Vergleich zu den Leitverbindungen 5-CQA und NMP in Abbildung 5-10 (a, b) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Induktion des Proteins durch den CQA-reichen AB 1 Extrakt. Die Expression wurde auf max. 220 % der Lösungsmittelkontrolle erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte der NMP-reiche AB 2 Extrakt bestenfalls eine leichte NQO1 Expression in allen geprüften Konzentrationen.

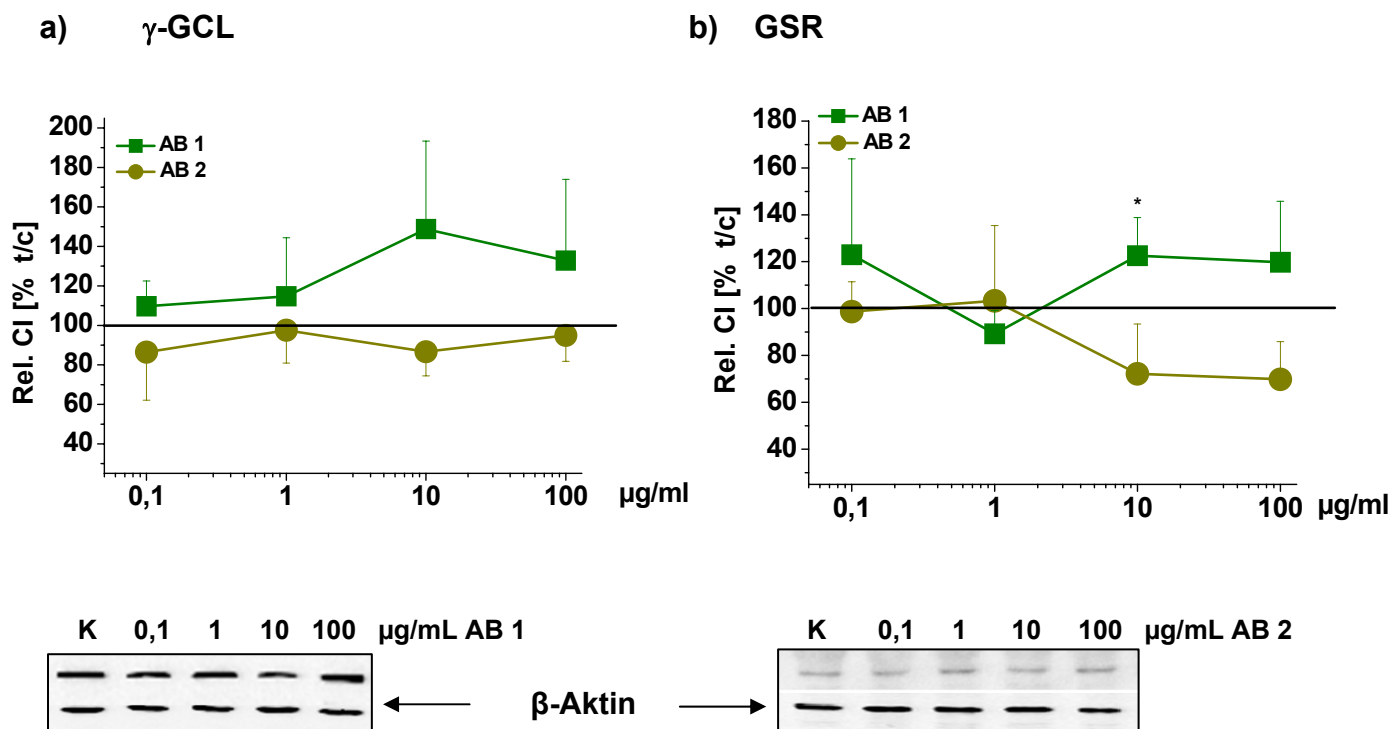


**Abbildung 5-10: Modulation der NQO1- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit a) AB 1 und AB 2 b) 5-CQA und NMP; (Zusatz 100 U/ml Katalase) 24h Inkubation: n=3 Mittelwert und SD; NQO1 Primär-Antikörper: mouse monoclonal-anti-NQO1 (1:2000); Sekundär-Antikörper goat-anti-mouse (1:1000); Beladungskontrolle: α-Tubulin; Signifikanz: \* p<0,05 \*\* p<0,01**

Die Leitverbindung des leicht gerösteten Kaffees 5-CQA zeigte eine signifikante Erhöhung des NQO1 Gehaltes im Konzentrationsbereich von 1-30 µM, mit maximaler Wirkungsstärke bei 10 µM (Erhöhung auf 200 % der Kontrolle). Durch NMP wurde nur eine leichte Erhöhung der NQO1 bei 1µM Konzentration beobachtet.

### γ-GCL und GSR Proteinexpression

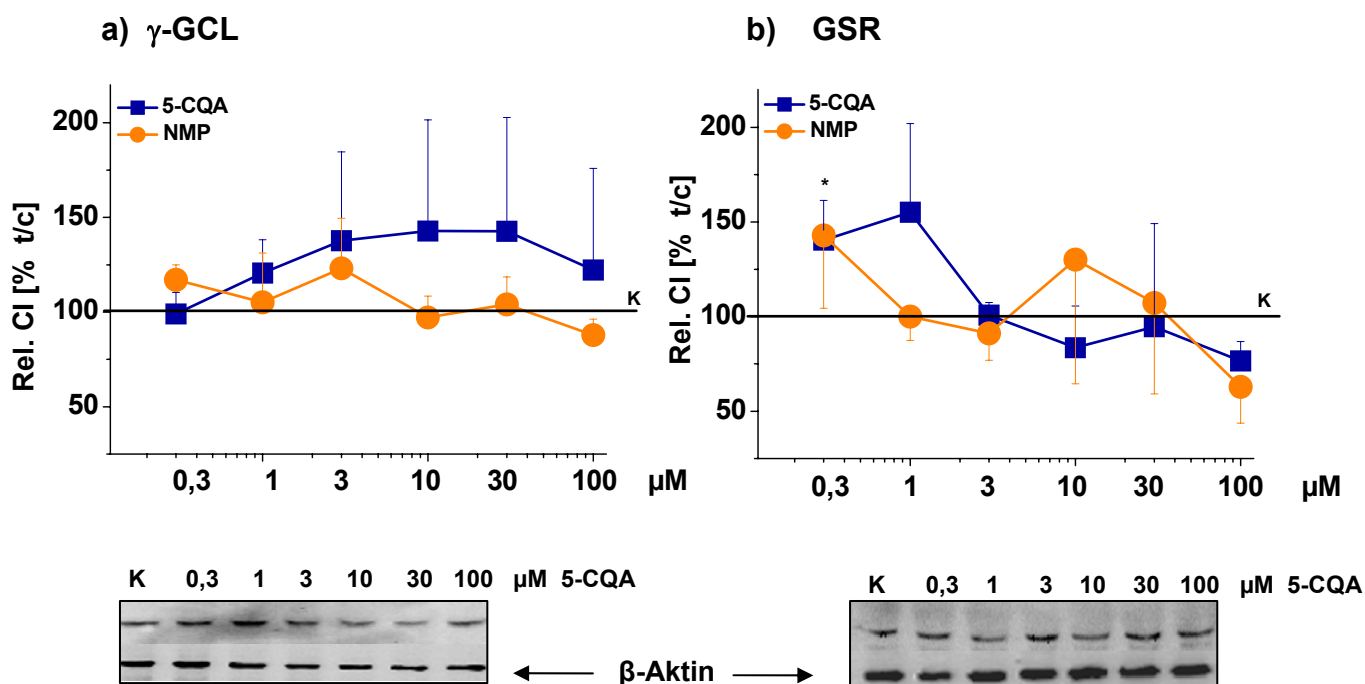
Außer NQO1 wurden auch die antioxidativen Enzyme γ-GCL und GSR in HT-29 Zellen nach 24h Inkubation mit den Kaffeeextrakten AB 1 und AB 2, (0,1-100 µg/ml) und den Kaffeeinhaltsstoffen 5-CQA und NMP, (0,3-100 µM) geprüft. Beobachtet wurde eine leichte Induktion beider Proteine durch AB 1, mit maximalem Anstieg auf 120 bzw.140 % (GSR bzw. γ-GCL) der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 5-11, a, b). Dagegen war der NMP-reiche AB 2 Extrakt im untersuchten Konzentrationsbereich 0,1-100 µg/ml nicht antioxidativ wirksam.



**Abbildung 5-11: Modulation der a)  $\gamma$ -GCL und b) GSR- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit AB 1 und AB 2 (Zusatz 100 U/ml Katalase);  $\gamma$ -GCL Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti- $\gamma$ -GCL (1:750); Sekundär-Antikörper goat-anti-rabbit (1:1000); GSR Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti GSR (1:750); Sekundär-Antikörper: goat anti rabbit ; Beladungskontrolle  $\beta$ -Aktin; n=3, Mittelwert und SD; Signifikanz: \*  $p < 0,05$**

5-CQA bewirkte eine konzentrationsabhängige Steigerung der  $\gamma$ -GCL Expression; GSR wurde nur leicht im Konzentrationsbereich von 0,3-1  $\mu$ M beeinflusst. NMP zeigte nur schwache Effekte (Abbildung 5-12, a, b).





**Abbildung 5-12: Modulation der a)  $\gamma$ -GCL und b) GSR- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit 5-CQA und NMP (Zusatz 100U/ml Katalase);  $\gamma$ -GCL Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti- $\gamma$ -GCL (1:750); Sekundär-Antikörper goat-anti-rabbit (1:1000); GSR Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti GSR (1:750); Sekundär-Antikörper: goat anti rabbit ; Beladungskontrolle  $\beta$ -Aktin; n=3, Mittelwert und SD; Signifikanz: \*  $p < 0,05$**

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine deutliche Induktion der ARE-abhängigen Enzyme durch den Chlorogensäure-reichen AB 1 Extrakt und 5-CQA (NQO1 >  $\gamma$ -GCL > GSR). Die Untersuchungen bestätigen die bereits in der Literatur beschriebene Induktion des Nrf2/ARE-Signalwegs *in vitro* und *in Tierstudie* mit Kaffee und Chlorogensäure [Cavin *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2009].

## 5.2 Zusammenfassung und Diskussion der *in vitro* Ergebnisse

Die *in vitro* Untersuchungen hatten zum Ziel ausgewählte Kaffeeextrakte und –inhaltsstoffe hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirksamkeit zu prüfen. Neben zellfreien Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität (TEAC und ORAC), wurden ROS-Level, (oxidativen) DNA-Schäden und Modulation ARE-abhängiger Enzyme in HT-29 und Caco-2 Zellen untersucht. Weiterhin wurde unter den Bedingungen der Zell-Inkubation auf Generierung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) im Medium geprüft, das durch die mögliche Oxidation von phenolischen Verbindungen entstehen und somit als zusätzlicher oxidativer Stress für die Zelle wirken kann [Halliwell, 2008; Lapidot *et al.*, 2002b].

Alle getesteten Kaffeeextrakte zeigten eine direkte **antioxidative Aktivität**, mit Werten von 0,9-1,5 mM Trolox (TEAC) und 2,5-2,8 mM Trolox (ORAC). Die Wirkung der mittelstark gerösteten Extrakte (RI, AC und AB) war ausgeprägter als die der leicht- und stark gerösteten. Die Untersuchung der antioxidativen Kapazität der ausgewählten Leitsubstanzen zeigte für phenolische Kaffeeinhaltsstoffe eine deutliche Wirkung im Bereich von 0,9-1,3 mM Trolox (TEAC) und 1,8-3,9 mM Trolox (ORAC), wobei die radikalabfangende Eigenschaft von 5-CQA und CA, in Übereinstimmung mit der Literatur [Gomez-Ruiz *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2006a], ausgeprägter war als der phenolischen Abbauprodukte. Die Alkylpyridinium-Verbindungen waren schwach (TEAC) bzw. nicht antioxidativ wirksam (ORAC). Durch Korrelationsberechnungen wurde versucht, die für die antioxidative Wirksamkeit der Kaffeeextrakte verantwortlichen Inhaltsstoffe zu ermitteln. Hier zeigte sich, dass die 5-CQA, als Leitsubstanz des leicht gerösteten AB 1 etwa 22 % zur antioxidativen Aktivität dieses Extraktes beiträgt; auch andere im Kaffee natürlich vorkommende phenolische Verbindungen scheinen sich auf das antioxidative Potential von AB 1 auszuwirken. Für die beobachtete antioxidative Aktivität der mittelstark gerösteten Extrakte spielen vermutlich sowohl natürlich vorkommende als auch während des Röstens gebildete Inhaltsstoffe eine bedeutende Rolle. NMP, die Leitverbindung des stark gerösteten AB 2 leistete dagegen keinen Beitrag; d.h. für die antioxidative Wirkung der AB 2 sind andere während des Röstens gebildete Inhaltsstoffe (z.B. Maillard Reaktionsprodukte) verantwortlich.

Die untersuchten Kaffeeextrakte und phenolischen Kaffeeinhaltsstoffe 5-CQA und CA waren in der Lage, während ihrer Inkubation in DMEM  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu bilden. Alkylpyridinium-Verbindungen sowie Cat und THB zeigten dagegen keine Wirkung. Dabei spielt der pH-Wert des Mediums bei der Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine große Rolle, da ein hoher pH-Wert ( $\text{pH} > 7$ ) die prooxidative Wirkung der phenolischen Verbindungen fördert [Bellion *et al.*, 2009]. Die entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge war außerdem stark vom verwendeten Medium abhängig: während in DMEM eine starke  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung beobachtet werden konnte, war die Konzentration in DMEM/F12 sehr niedrig. Letzteres enthielt Pyruvat, das radikalfangende Eigenschaften besitzt [Babich *et al.*, 2009; Long and Halliwell, 2009]. Im Medium generiertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde durch Zugabe von 100 U/ml Katalase effektiv abgebaut. Bei Anwesenheit von Zellen war kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  mehr messbar, dieses wurde wahrscheinlich von den Zellen inaktiviert.

Der **TBH-induzierte ROS-Level** in HT-29 Zellen wurde durch die Kaffeeextrakte unterschiedlich verringert. Während stark gerösteter AB 2 Extrakt über den gesamten

untersuchten Konzentrationsbereich (1-250 µg/ml) eine signifikante Abnahme bewirkte, war leicht gerösteter AB 1 nur schwach wirksam. Mittelgeröstete AB, AC und RI zeigten die protektiven Eigenschaften erst ab einer Konzentration von 10 µg/ml. Von den ausgewählten Leitsubstanzen wurde nur mit 5-CQA, in Übereinstimmung mit der Literatur [Schaefer *et al.*, 2006a], eine antioxidative Wirkung beobachtet; NMP war nicht effektiv. Unter Berücksichtigung der Konzentrationen dieser Verbindungen in den Extrakten wurde versucht deren Beitrag für die antioxidative Wirksamkeit der Extrakte zu vermitteln. Es zeigte sich, dass 5-CQA für die Reduktion des ROS-Levels durch 100 µg/ml AB 1 einen direkten Beitrag leistete. Da NMP selbst keine Wirkung zeigte, wurde vermutet, dass die ausgeprägte antioxidative Wirksamkeit des stark gerösteten AB 2 durch andere, während des Röstens gebildete Verbindungen (z.B. Melanoidine) hervorgerufen wird [Goya *et al.*, 2007].

Im Gegensatz zu beobachteter Unwirksamkeit der Alkylpyridinium-Verbindungen im DCF-Assay zeigten methylierte NMP-Analoga eine Verringerung der (oxidativen) **DNA-Schäden** in Caco-2 Zellen. Von den untersuchten phenolischen Kaffeeinhaltsstoffen war nur in Übereinstimmung mit der Literatur [Schaefer *et al.*, 2006a] am effektivsten.

Die **Proteinexpression der ARE-abhängigen Enzyme** in HT-29 Zellen wurde durch die ausgewählten Kaffeeextrakte AB 1 und AB 2 sowie deren Leitverbindungen 5-CQA und NMP unterschiedlich moduliert. Es wurde eine deutliche Induktion aller getesteten Enzyme (NQO1,  $\gamma$ -GCL und GSR) durch den leichtgerösteten, CQA-reichen AB 1 beobachtet. Der stark geröstete AB 2 war schwach (NQO1), bzw. nicht antioxidativ wirksam ( $\gamma$ -GCL, GSR). Von den untersuchten Leitverbindungen zeigte 5-CQA analog wie AB 1 eine ausgeprägte Induktion der NQO1 und  $\gamma$ -GCL Proteine. NMP wies eine nur schwache Wirkung auf. 5-CQA scheint einen großen Anteil an den beobachteten antioxidativen Effekten durch AB 1 zu haben. Ein derartiger Einfluss durch NMP auf AB 2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die leichtgeröstete AB 1 und seine Leitverbindung 5-CQA wurden als potente Aktivatoren des Nrf2/ARE-Signalwegs identifiziert. In der Literatur wurde bereits von einer Erhöhung verschiedener ARE-regulierender Gene (NQO1, GST) nach Inkubation mit Chlorogensäure in murinen Epidermiszellen (JB6) berichtet [Feng *et al.*, 2005]. Über eine kaffeebedingte *in vitro* Modulation der ARE-abhängigen Enzyme liegen in der Literatur bisher noch keine Daten vor, jedoch wurde im Rahmen einer

Tierstudie an Mäuse mit Kaffee eine Erhöhung der mRNA Menge der NQO1 und  $\gamma$ GCL in der Leber und dem Dünndarm erfasst [Higgins *et al.*, 2008].

Die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die leicht, mittel und stark gerösteten Kaffeeextrakte ausgeprägte antioxidative Eigenschaften besitzen und in der Lage sind, oxidative Zellschäden zu reduzieren. Dies ließ sich zum Teil auf die im Kaffee natürlich vorkommenden Inhaltsstoffe (leichte Röstung) und Röstprodukte (starke Röstung) zurückführen. Auf Grund der komplexen Mischung der Extrakte kann jedoch die Beteiligung anderer Substanzen, die z.B. während des Röstens entstehen, nicht ausgeschlossen werden; auch antagonistische und synergistische Effekte der Extraktinhaltsstoffe sind möglich.

### 5.3 Pilotinterventionsstudie an Probanden

Im Rahmen des Projektes wurde eine 12-wöchige Pilotinterventionsstudie in der DFA Garching (AG Somoza) durchgeführt (s. 4.14.1). Insgesamt 30 Probanden nahmen nach einer zweiwöchigen Kaffee-freien (1. Wash-out) Phase über einen Zeitraum von vier Wochen 500 ml CQA-reichen Kaffee (AB 1, hergestellt aus schwach gerösteten Bohnen,  $\Sigma\text{CQA}$ :1606,5 mg/l) täglich als Bolus zu sich. Nach einer weiteren zweiwöchigen 2. Wash-out Phase erhielten die Probanden nochmals vier Wochen lang täglich 500 ml NMP-reichen Kaffee (AB 2, hergestellt aus stark gerösteten Bohnen, NMP:71,2 mg/l). Die zur fünf Zeitpunkten gewonnene Blutproben wurden jeweils zu Beginn und Ende der Verabreichung des CQA- und NMP-Kaffees und zu Beginn der 1. Wash-out Phase entnommen (Abbildung 5-13) und zwischen den Kooperationspartnern verteilt.

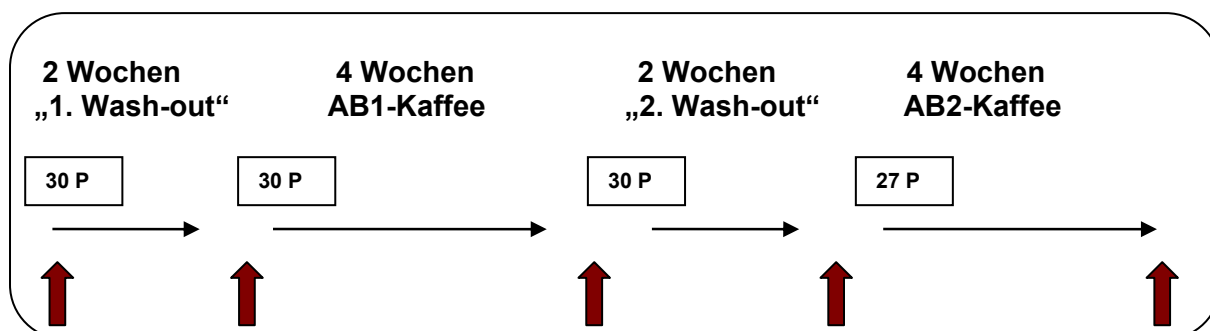


Abbildung 5-13: Design der Pilotinterventionsstudie. ↑ Blutentnahme; P: Probanden

#### 5.3.1 Modulation oxidative DNA-Schäden im Vollblut

Die gewonnene Blutproben auf oxidative DNA-Schäden (Comet Assay, s. Kapitel 4.5) untersucht. Der Vergleich der TI% der Proben mit und ohne FPG Behandlung (Abbildung 5-14) macht deutlich, dass der überwiegende Anteil der gesamt DNA-Schäden (mit FPG) auf oxidativen Veränderungen beruht; die DNA-Grunds Schäden (ohne FPG) sind maximal zu 25% an der Gesamtschädigung beteiligt. Nach vierwöchigem Intervention von AB 1 wurde eine hochsignifikante Verringerung der Gesamt DNA-Schäden (mit FPG) auf 78 % der Werte der vorausgehenden ersten Wash out Phase beobachtet ( $***p < 0.001$ ;  $n=30$ ). Während der zweiwöchigen zweiten

Wash out Phase zeigte sich ein langsamer Wiederanstieg der Gesamtschäden, ohne das Niveau der ersten Wash-out Phase zu erreichen. Die vierwöchige Aufnahme von AB 2 bewirkte eine Abnahme der Gesamt DNA-Schäden um 15% im Vergleich zur zweiten Wash out Phase ( $p=0.08$ ;  $n=27$ ). Im Gegensatz zu den Gesamtschäden (mit FPG) wurden die DNA-Grundschäden durch beiden Kaffeeinterventionen nicht beeinflusst.

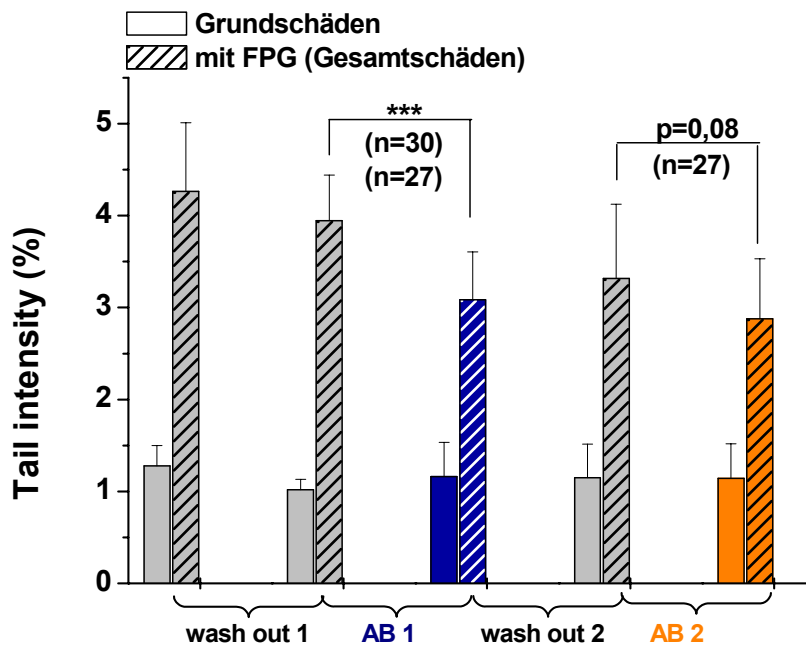
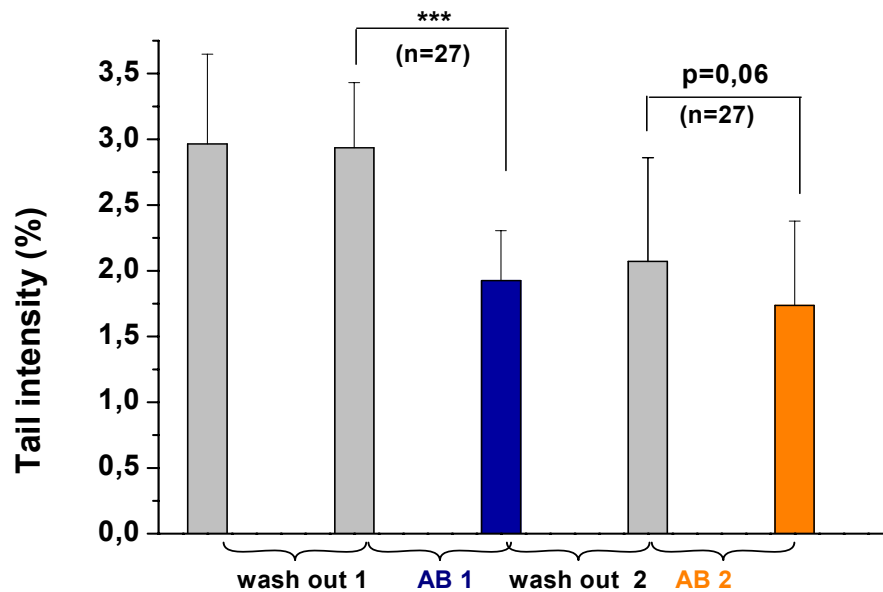


Abbildung 5-14: Modulation der (oxidativen) DNA-Schäden bei Probanden (Signifikanz \*\*\*  $p<0.001$ . t- Test, Einseitig, gepaart)

Bei Betrachtung der spezifisch oxidativen DNA-Schäden (Abbildung 5-15) sind die antioxidativen Effekte der Kaffeegetränke noch deutlicher sichtbar. AB 1 bewirkte eine Abnahme der Schäden um 35%, AB 2 um 21%.



**Abbildung 5-15: Modulation der spezifisch oxidativen DNA-Schäden bei Probanden (Signifikanz \*\*\*  $p < 0,001$ . t- Test, Einseitig, gepaart)**

Zusammenfassend bewirkten beide Kaffeegetränke im Vollblut der Probanden eine Abnahme (oxidativer) DNA-Schäden, die nach Konsum von AB 1 deutlicher war als bei AB 2. Es ist dabei jedoch offen, ob die beobachtete Wirkungsstärke von AB 2 durch die vorausgehende AB 1 Aufnahme beeinflusst wird, da die nach dem zweiten Wash-out (2 Wochen) gemessenen DNA-Schäden niedriger sind als die entsprechenden Werte nach der ersten Wash-out Phase. Dieser Aspekt wurde in der nachfolgenden 2. Humanstudie durch eine längere Wash-out Phase berücksichtigt. Die beobachtete antioxidative Wirkung von Kaffee wurde durch eine von Bichler et al durchgeführten Studie an gesunden Probanden bestätigt [Bichler *et al.*, 2007]. Interventionsstudien mit polyphenolreichen Säften zeigten ebenfalls eine Reduktion (oxidativer) DNA-Schäden bei gesunden Probanden und bei Hämodialyse Patienten [Spormann *et al.*, 2008; Weisel *et al.*, 2006], was sowohl den Radikalfänger-Eigenschaften der Polyphenole als auch der verstärkten Neusynthese endogener Antioxidantien und der gesteigerten DNA-Reparaturaktivität infolge der Aufnahme von Früchten oder Fruchtsaft zugeschrieben wurde [Collins *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2003; Weisel *et al.*, 2006].

## 5.4 Zweite Humanstudie an Probanden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweite 12 wöchige Interventionsstudie (TU Kaiserslautern) an 35 Probanden durchgeführt (s. 4.14.2), um die protektive Wirksamkeit eines Kaffees (*Coffea Arabica*) mit besonders hohem Gehalt an Antioxidantien, die natürlich vorkommenden sowie die während des Röstens entstandenen Inhaltsstoffe, für einen gesunden Organismus zu untersuchen. Bestimmt wurden Biomarker der oxidativen Zellschädigung (Comet Assay), des zellulären Oxidationsstatus (GSH-Status) und der Zellantwort (tGSH-Spiegel). Um fest zustellen, inwieweit der Studienkaffee die Entwicklung des Körpergewichts eine Rolle spielen könnte, wurden auch die Entwicklung von Körpergewicht und Körperzusammensetzung sowie der Nahrungsaufnahme der Probanden erfasst.

### 5.4.1 Compliance

An dem ersten und zweiten Untersuchungs-/Blutentnahmeterrmin nahmen 35 Probanden teil (Abbildung 5-16). In der ersten Woche der „Kaffee-Phase“ beendeten zwei Probanden auf eigenen Wunsch ihre Teilnahme an der Studie. Somit wurde die Studie ab der 3. Blutentnahme bis zum Ende mit 33 Probanden durchgeführt; dies entspricht 94% der zu Studienbeginn vorhandenen Probandenzahl. Bei einem Probanden war die 3. Untersuchung/Blutentnahme nicht termingerecht durchführbar; in diesem Fall wurde die Interventionsphase um eine Woche verlängert.

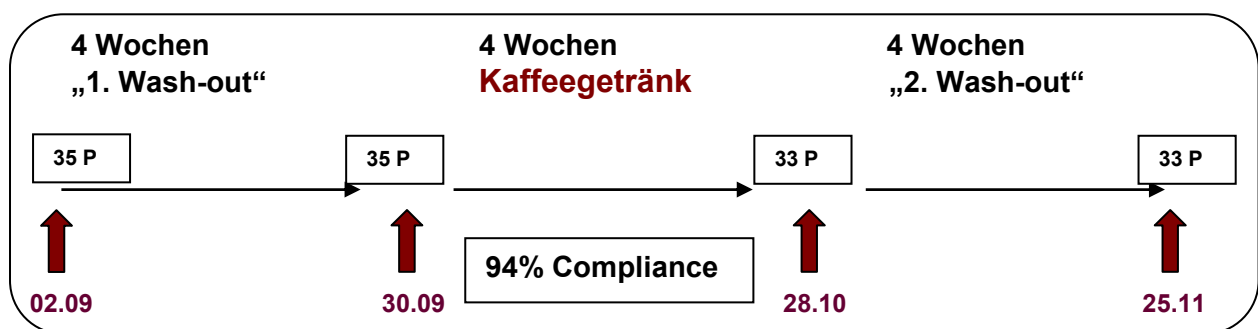


Abbildung 5-16: Studiendesign ( P: Probanden, ↑ Untersuchungs-/Blutentnahmeterrmine)

Während der Kaffeephase wurden Interviews mit den Probanden durchgeführt, in denen nach sensorischen Eindrücken und Verträglichkeit des Kaffeegetränkes gefragt wurden. Die überwiegende Zahl der Probanden (80%) beschrieb den Kaffee als wohlschmeckend (in Richtung Espresso) und gut verträglich. 14% der Probanden empfanden den Kaffee geschmacklich weniger angenehm, 6% (2 Probanden)



berichteten von Unverträglichkeiten (Magenprobleme und Schlafstörungen), welche diese Personen veranlassten die Studie abubrechen.

#### 5.4.2 Entwicklung von Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Während der vier Untersuchungstermine wurden Körpergewicht und Körperzusammensetzung der Probanden erfasst. Hierfür wurden die Probanden morgens nüchtern (nur mit Unterhose bekleidet) gewogen, unmittelbar anschließend wurde die Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse (s. 4.13) gemessen. Die erhaltenen Daten für Körpergewicht, BMI, Körperfett, Magermasse und Gesamtkörperwasser sind in Tabelle 5-4 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme von Körpergewicht und BMI in der ersten Wash-out Phase (zwischen 1. und 2. Untersuchung.  $p < 0.05$ ). Nach der Kaffeephase wurde eine noch deutlichere Reduktion von Körpergewicht, BMI und Körperfett beobachtet (zwischen 2. und 3. Untersuchung.  $p < 0.01$  bzw.  $p < 0.05$ ). Nach dem zweiten Wash-out (zwischen 3. und 4. Untersuchung) stiegen diese Parameter wieder an, ohne jedoch den Wert der 2. Untersuchung zu erreichen. Magermasse und Gesamtkörperwasser blieben in allen Phasen nahezu unverändert.

**Tabelle 5-4: Körpergewicht, Körperfett und Magermasse der Probanden bei den vier Untersuchungsterminen; (n=33)**

Parameter	1. Untersuchung: Studienbeginn	2. Untersuchung: nach 1. Wash-out	3. Untersuchung: nach KaffeeP	4. Untersuchung: nach 2. Wash-out
Körpergew.[Kg]	85,19 ± 13,25	84,85 ± 12,95	84,24 ± 13,3	84,50 ± 13,69
BMI [Kg/m <sup>2</sup> ]	25,6 ± 3,7	25,5 ± 3,7	25,3 ± 3,8	25,3 ± 3,9
Körperfett [Kg]	20,42 ± 8,19	20,0 ± 8,54	19,36 ± 8,56	19,49 ± 8,74
MAMA* [Kg]	64,78 ± 6,73	64,82 ± 6,47	64,87 ± 6,76	64,93 ± 6,94
Wasser* [L]	47,42 ± 4,9	47,44 ± 4,8	47,49 ± 4,9	47,5 ± 4,9

**BMI:** Body-Mass-Index; **KaffeeP:** Kaffeephase; **MAMA:** Magermasse; **Wasser:** Gesamtkörperwasser; Mittelwerte und SD; einseitig, gepaarter t-Test.

Zur Verdeutlichung dieser Veränderungen wurden für jeden Probanden die Differenzen von Körpergewicht und Körperfett zwischen den Untersuchungsterminen berechnet. In Abbildung 5-17 ist die Entwicklung dieser Parameter in den drei Studienphasen dargestellt. In der ersten Wash-out Phase betrug der Gewichtsverlust  $0.34 \pm 1.6$  kg; das Körperfett war durchschnittlich um  $0.38 \pm 1.1$  kg verringert. Während der nachfolgenden Kaffeephase wurden Körpergewicht und Körperfett der Probanden deutlicher reduziert (um 0.62 bzw. 0.68 kg). In der zweiten Wash-out Phase stiegen Körpergewicht und Körperfett wieder leicht an, nämlich um 0.26 bzw. 0.13 kg. Die Ergebnisse verdeutlichen den bereits in Tabelle 5-4 dargestellten Gewichtsverlust der Probanden in der Kaffeephase. Der Kaffeeconsum ist eindeutig mit einer Gewichtsreduktion assoziiert. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass der Gewichtsverlust mit einer Abnahme des Körperfettgehaltes korreliert. Zur Gewichtszunahme in der zweiten Wash-out Phase tragen sowohl Körperfett, als auch Magermasse bei.

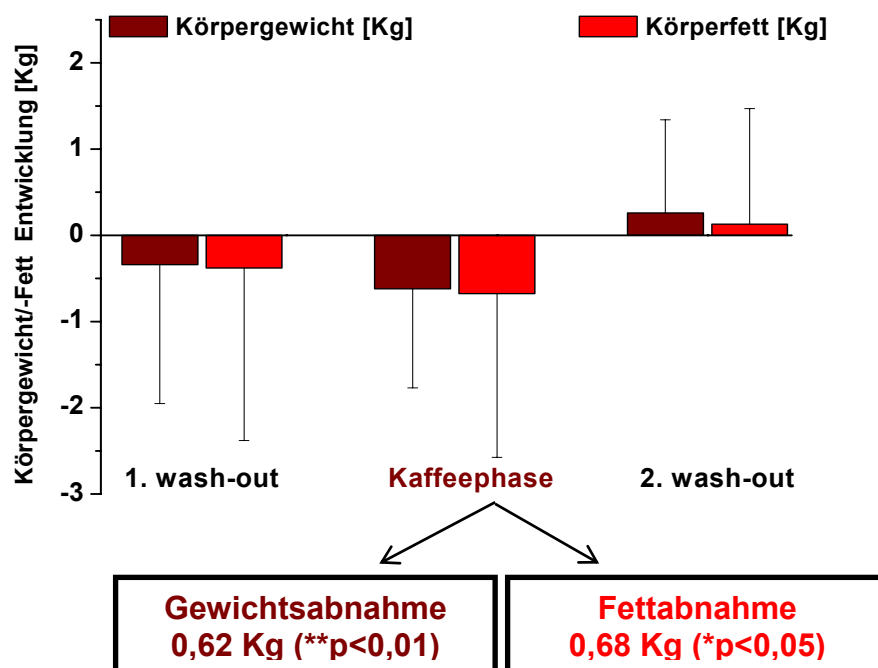


Abbildung 5-17: Entwicklung von Körpergewicht und Körperfett der 33 Probanden während ersten Wash-out Phase, Kaffeephase und zweiten Wash-out Phase. Dargestellt ist die Differenz in kg zwischen Beginn und Ende der jeweiligen Phase: Mittelwerte und SD; Signifikanz: \*\* p<0,01, \* p<0,05, t- Test, einseitig, gepaart

Abbildung 5-18 ist exemplarisch die Körpergewichtsentwicklung der einzelnen Probanden während der Kaffeephase, geordnet nach steigendem BMI dargestellt. Die Ergebnisse zeigen bei 76 % der Probanden eine Gewichtsreduktion während der Kaffeephase; bei 6 % blieb das Körpergewicht unverändert und bei 18 % wurde ein

Anstieg beobachtet. Die Gewichtsabnahme war bei Probanden mit einem BMI < 25 ( $p < 0,001$ , t-Test) deutlicher ausgeprägt als bei den Probanden mit einem BMI > 25 ( $p > 0,05$ , t-Test).

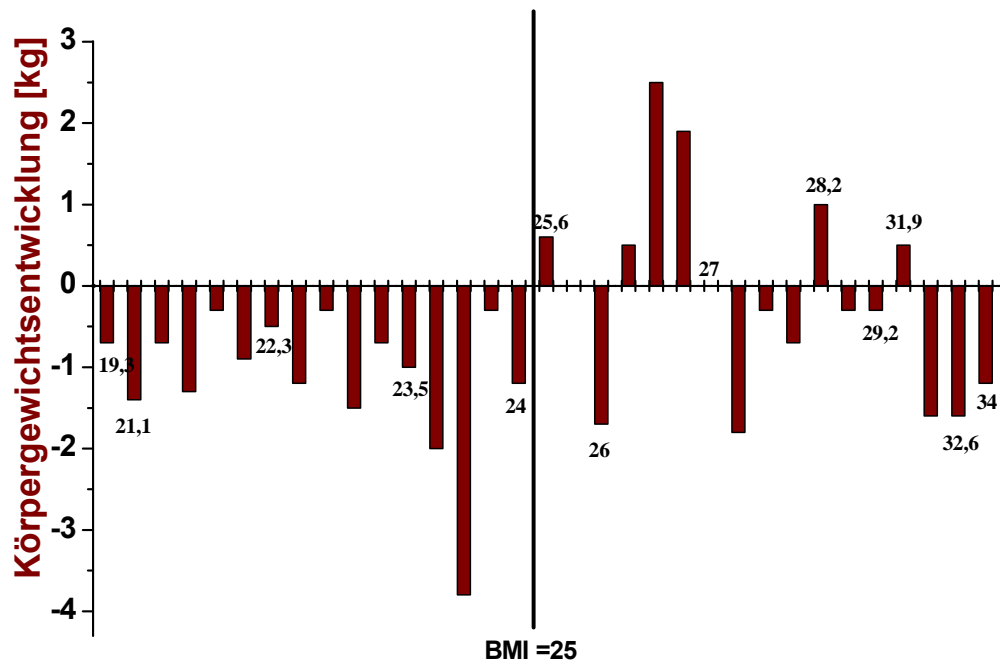
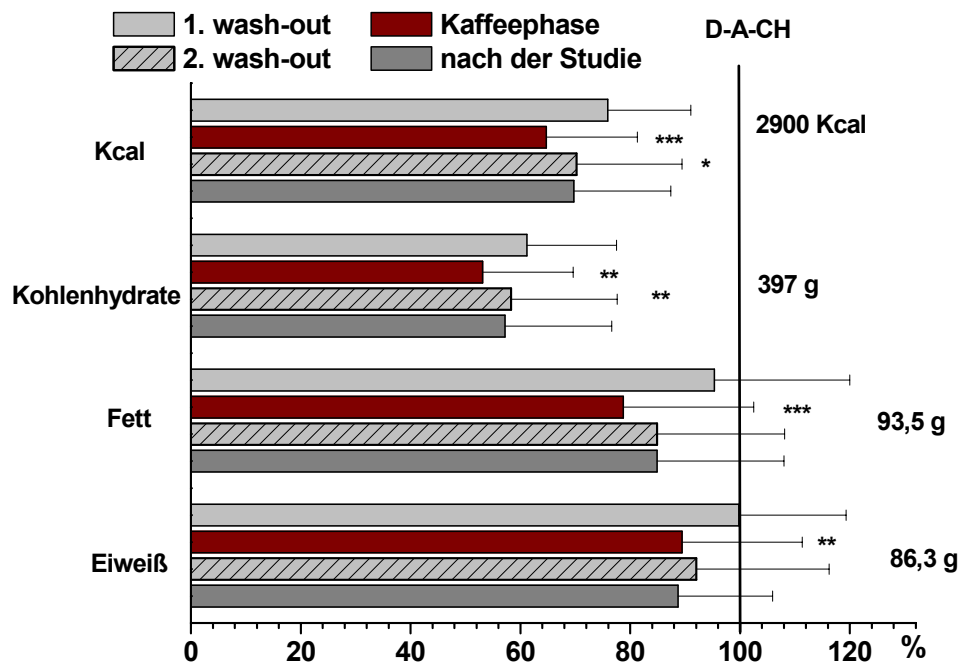


Abbildung 5-18: Individuelle Körpergewichtsentwicklung der 33 Probanden während der Kaffeephase in kg, geordnet nach steigendem BMI (19,3 – 34,0), dargestellt als Differenz: 2. Untersuchung minus 3. Untersuchung

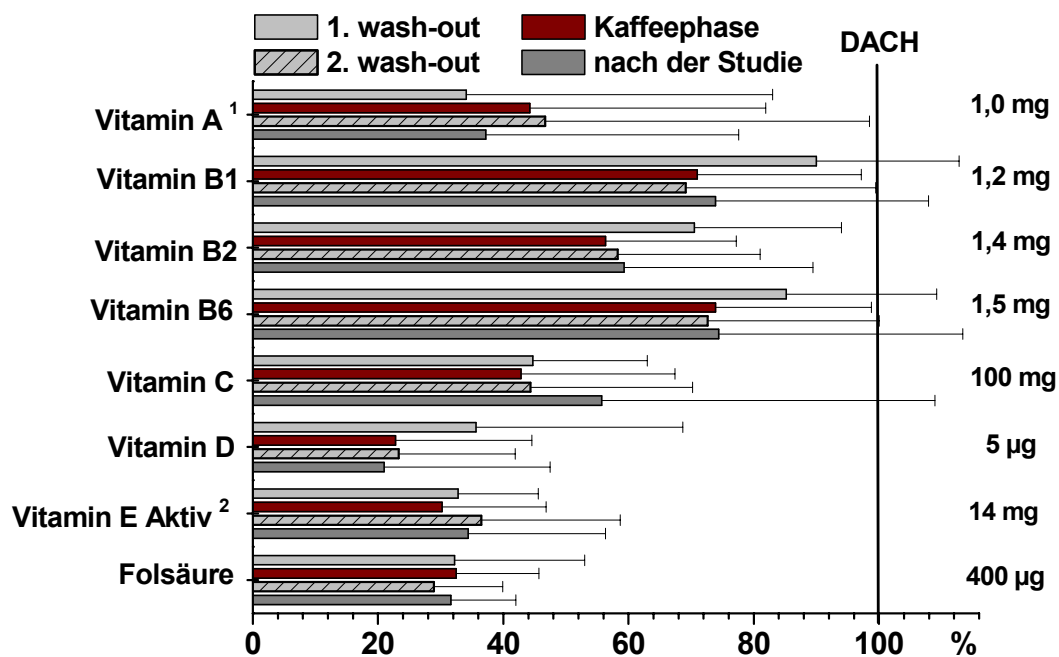
### 5.4.3 Energie- und Nährstoffaufnahme

In Abbildung 5-19 ist die durchschnittliche tägliche Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden in den Studienphasen sowie nach Studienende im Vergleich zur Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr (D-A-CH) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die durchschnittliche tägliche Zufuhr an Eiweiß den Empfehlungswert annähernd erreicht, die entsprechende Aufnahme an Kilokalorien, Kohlenhydraten und Fett war dagegen deutlich verringert. Der Vergleich der Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden während der Studienphasen und nach Studienende zeigt eine signifikante Verringerung in der Kaffeephase (Abbildung 5-18). In der nachfolgenden zweiten Wash-out Phase stiegen die Werte wieder an. Nach Studienende, unter den individuellen Ernährungsgewohnheiten der Probanden entsprach die Aufnahme an Energie und Nährstoffen nahezu den Werten der zweiten Wash-out Phase.



**Abbildung 5-19:** Durchschnittliche tägliche Nährstoffaufnahme der 33 Probanden in den Studienphasen in %, bezogen auf D-A-CH (Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr von Deutschland, Österreich und Schweiz. 2000; modifiziert nach DGE, 2001; Altersgruppe 25-51 Jahre); Mittelwerte und SD; Unterschied zur vorausgehenden Phase: Signifikanz: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Prüfung auf Normalverteilung; t-Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).

Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Vitaminen (Abbildung 5-20) war in allen Studienphasen niedriger als die entsprechende DACH-Empfehlung. Möglicherweise ist die erniedrigte Energie-/Nährstoff- und Vitaminaufnahme auf die Einschränkungen in der Auswahl der Nahrungsmittel (polyphenolarme Ernährung) zurückzuführen.

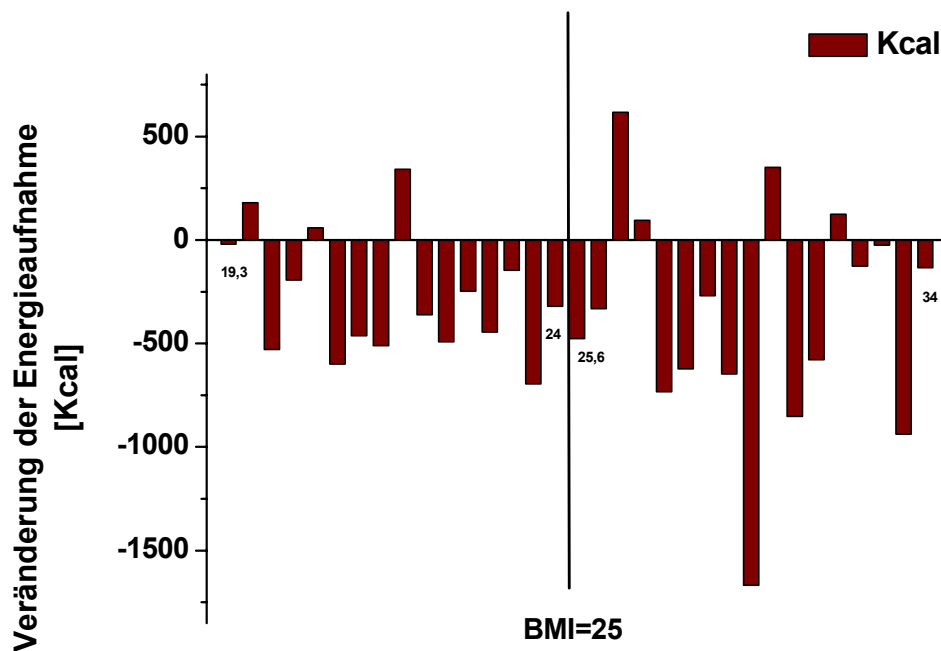


**Abbildung 5-20:** Durchschnittliche tägliche Vitaminaufnahme der 33 Probanden in den Studienphasen in %, bezogen auf D-A-CH (Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr von Deutschland, Österreich und Schweiz. 2000; modifiziert nach DGE, 2001; Altersgruppe 25-51 Jahre). Mittelwerte und SD

<sup>1</sup> Retinol-Äquivalent

<sup>2</sup> Tocopherol-Äquivalent

In Abbildung 5-21 ist die Veränderung der täglichen Energieaufnahme der einzelnen Probanden während der Kaffeephase, geordnet nach steigendem BMI, dargestellt. Bei 79 % der Probanden zeigte die Auswertung der Ernährungsprotokolle eine signifikant erniedrigte Energieaufnahme während der Kaffeeintervention. BMI-Abhängige Veränderung wurde nicht beobachtet.



**Abbildung 5-21: Veränderung der täglichen Energieaufnahme während der Kaffeephase (dokumentiert über 7 Tage), dargestellt als Differenz: Kaffeephase minus 1. Wash-out Phase. 33 Probanden. geordnet nach steigendem BMI (19,3 – 34,0); Signifikanz:  $p < 0,001$ . bei der Gruppe mit BMI < 25;  $p < 0,01$ . bei der Gruppe mit BMI > 25**

Um Aussagen über den Einfluss der Ernährung während der Studie auf die BIA Messergebnisse (Körpergewicht und Körperfett) machen zu können, wurde geprüft ob eine Korrelation zwischen den beiden Parameter vorliegt. In Abbildung 5-22 ist die Veränderung von Energieaufnahme und Körpergewicht sowie Fettaufnahme und Körperfett in Kaffee- und zweiten Wash-out Phase, gemittelt über alle Probanden dargestellt. Die Ergebnisse zeigen gleichsinnigen Verlauf der Veränderungen: In der Kaffeephase nehmen alle Parameter ab, gefolgt von einem Wiederanstieg in der zweiten Wash-out Phase.

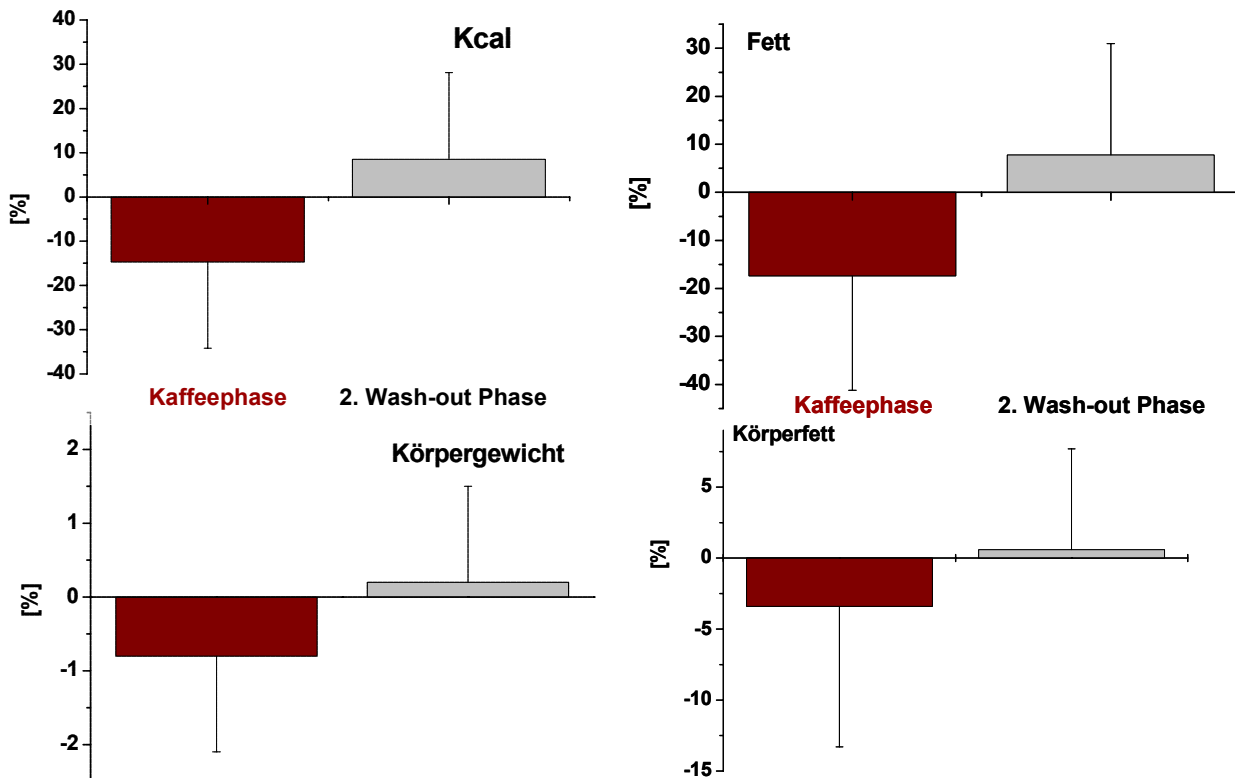


Abbildung 5-22: Veränderung der Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden in der Studienphasen; Dargestellt als Differenz in %, bezogen auf den Ausgangswert der jeweiligen Phasen; n=33, Mittelwert und SD

#### 5.4.4 Modulation der Biomarker

##### 5.4.4.1 DNA-Schäden

Die Ergebnisse zur Modulation von DNA-Schäden im Vollblut von Probanden sind in Abbildung 5-23 dargestellt. Beide DNA-Schädigungsmarker (mit/ohne FPG) wurden in Verlauf der Studie gleichsinnig moduliert: In der ersten Wash-out Phase erhöhte sich das Schädigungsniveau signifikant, gefolgt von einer hochsignifikanten Abnahme der Strangbrüche und Gesamtschäden (auf 61 bzw. 56 %) während der Kaffeeintervention. In der zweiten Wash-out Phase erfolgte ein signifikanter Wiederanstieg der Schäden, ohne jedoch den Ausgangswert zu erreichen. Dies legt nahe, dass die protektive Wirkung des Studienkaffees nach dem vierwöchigen Wash-out noch nicht vollständig aufgehoben war.

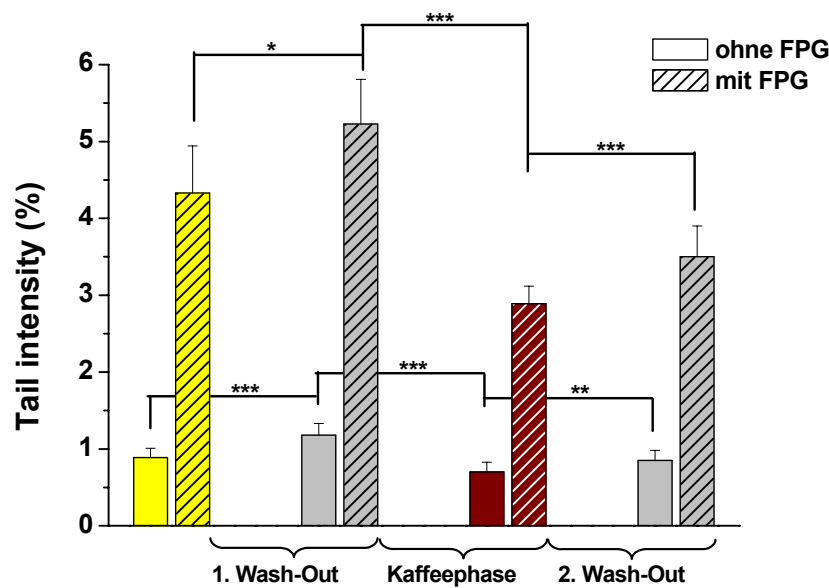


Abbildung 5-23: Modulation der (oxidativen) DNA-Schäden. n=33. Mittelwerte und SD. Signifikanz: \*\*\*p<0,001. \*\* p<0,01. \* p<0,05. Prüfung auf Normalverteilung; t-Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).

Die **spezifisch oxidativen DNA-Schäden** (Differenz von Gesamtschäden und DNA-Strangbrüchen) wurden während der Intervention auf 53 % verringert. Dies dokumentiert die antioxidativen Effekte des Studienkaffees besonders deutlich (Abbildung 5-24).

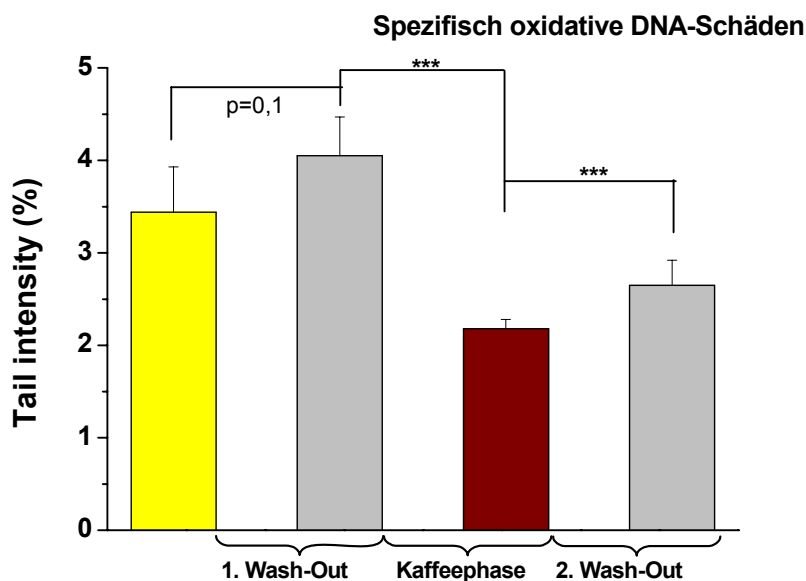


Abbildung 5-24: Modulation der spezifisch oxidativen DNA-Schäden. n=33. Mittelwerte und SD. Signifikanz: \*\*\*p<0,001. t-Test, einseitig, gepaart



In Abbildung 5-25 sind die Einzelwerte mit und ohne FPG Behandlung der alle 33 Teilnehmer der Intervention mit dem Kaffee dargestellt. Die Werte der einzelnen Probanden lagen sehr dicht beieinander, lediglich in der 1. und 2. Blutentnahme (mit FPG Behandlung) gab es eine größere Streubreite. Während der Kaffeeaufnahme wurde die Streuung relativ zum Mittelwert kleiner (mit FPG Behandlung).

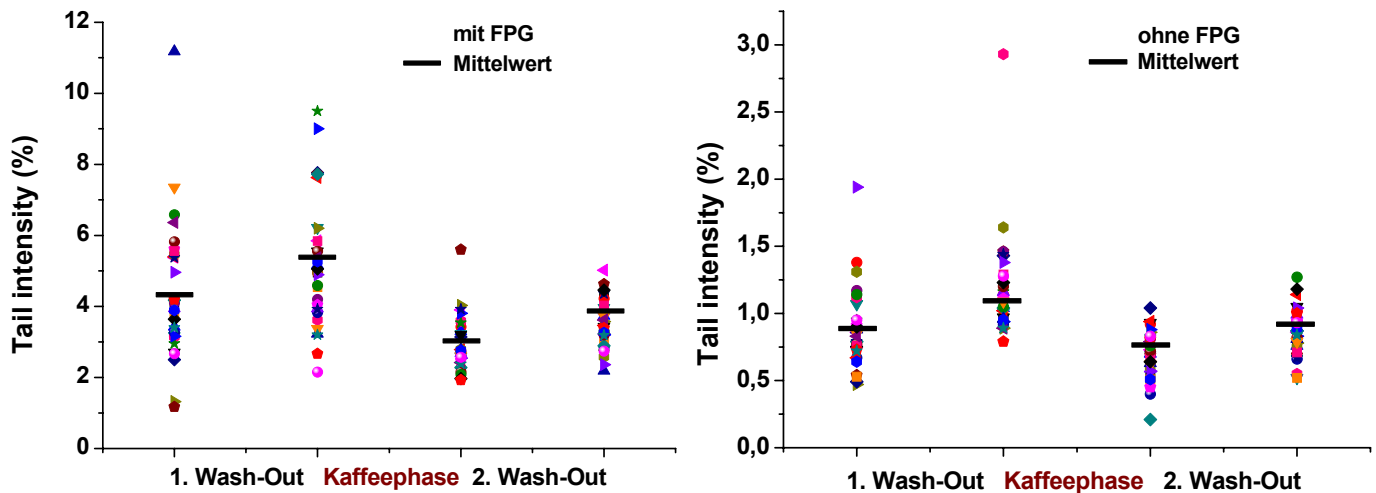
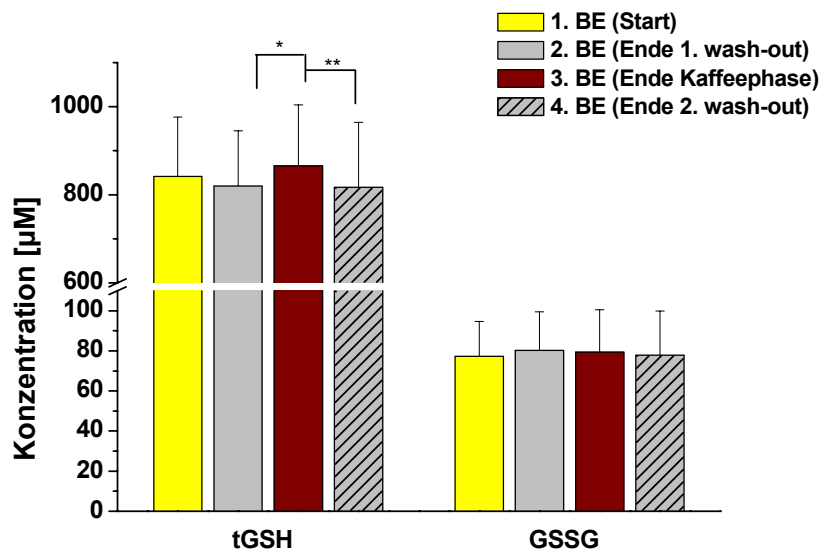


Abbildung 5-25: DNA-Schäden (ohne/mit FPG) in Vollblut. Einzelwerte der 33 Probanden, sowie Mittelwert (Strich) über alle Probanden; n=1

#### 5.4.4.2 Glutathionspiegel (tGSH) und Glutathionstatus

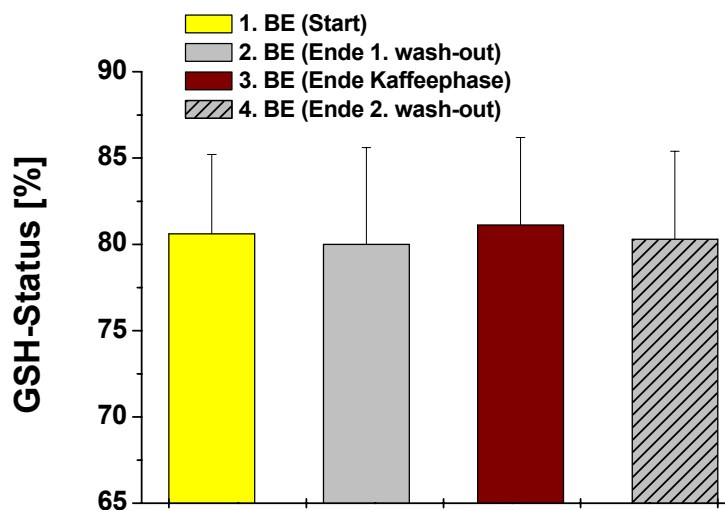
Als Marker für die Zellantwort wurde Glutathion (tGSH) und oxidiertes Glutathiondisulfid (GSSG) in Vollblut bestimmt und daraus reduziertes Glutathion (GSH) und Glutathion-Status als Marker für Redoxstatus ermittelt.

Die erhaltenen Daten für tGSH und GSSG sind in Abbildung 5-26 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Abnahme von tGSH in der ersten Wash-out Phase. Während der vierwöchigen Kaffeephase zeigte sich ein signifikanter Anstieg des tGSH-Levels, die in der nachfolgenden zweiten Wash-out Phase wieder signifikant aufgehoben wurde. Der GSSG-Spiegel blieb in allen Phasen nahezu unverändert.



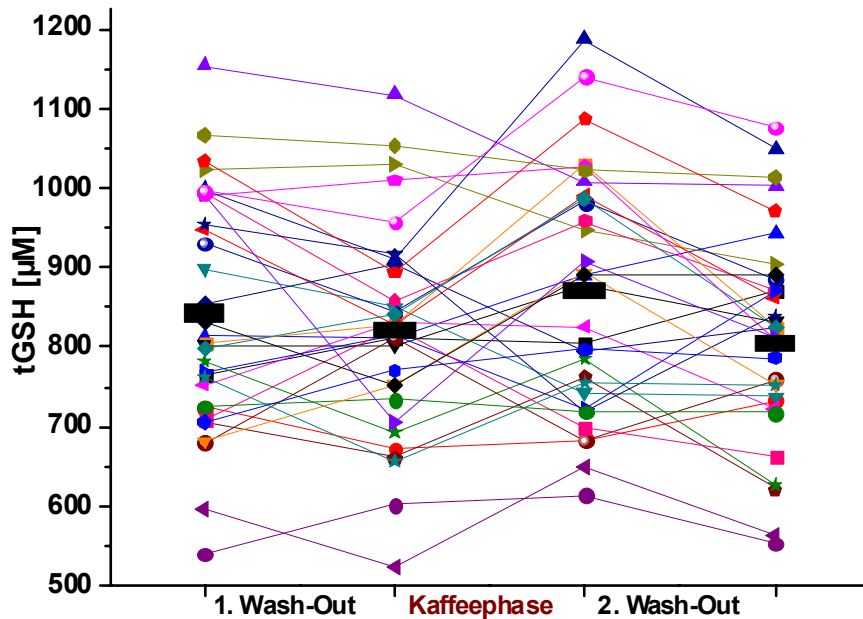
**Abbildung 5-26: Modulation des GSH- und GSSG-Spiegels in Vollblut in der Interventionsstudie n=33, Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD; Signifikanz: \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Prüfung auf Normalverteilung; t- Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).**

Die GSH-Status (reduziertes GSH in % des tGSH) aller Probanden wurde in den Studienphasen gleichsinnig zum GSH-Spiegel, aber nicht signifikant, moduliert (Abbildung 5-27).



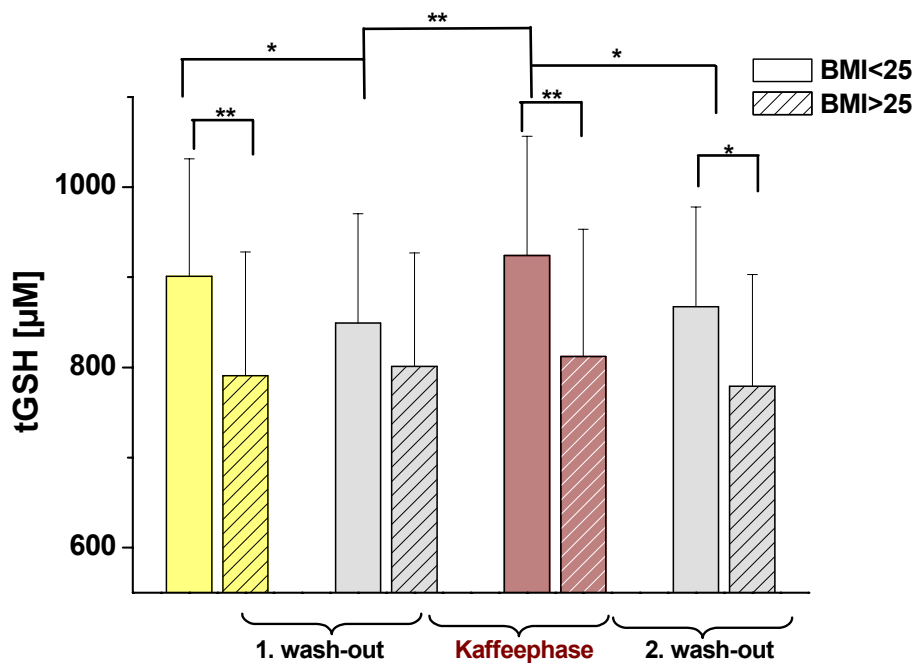
**Abbildung 5-27: GSH-Status in Vollblut, n=33, Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD; Signifikanz: \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . Prüfung auf Normalverteilung; t- Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).**

In der nachfolgenden Abbildung 5-28 wird deutlich, dass die tGSH Werte der einzelnen Probanden sich sehr stark voneinander unterscheiden. So gibt es Probanden die immer sehr hohe oder sehr niedrige tGSH- Gehalte aufweisen. Dargestellte zeitliche Verlaufsunterschiede weisen auf inter-individuelle Stoffwechselunterschiede hin.



**Abbildung 5-28: Modulation des GSH-Spiegels in Vollblut. Zeitlicher Verlauf der Einzelwerte, sowie Mittelwerte (Strich); n=33, Dreifachbestimmung**

Weiterhin wurde geprüft, ob der BMI der Probanden den GSH-Spiegel beeinflusst (Abbildung 5-29). In Übereinstimmung mit Literaturdaten [Charles *et al.*, 2008] wies die Gruppe mit BMI>25 bereits zu Studienbeginn signifikant niedrigere GSH-Spiegel auf als die Gruppe mit BMI<25. Außerdem wurde bei den Probanden mit BMI<25 ein Einfluss der Studienphasen auf den GSH-Spiegel deutlich. Dies zeigte sich auch in einem signifikant erhöhten Spiegel während der Kaffeephase (im Vergleich zu beiden Wash-out Phasen). Bei den Probanden mit BMI >25 waren signifikante Unterschiede zwischen den Studienphasen nicht nachweisbar.



**Abbildung 5-29: Modulation des GSH-Spiegels in Vollblut: Einfluss des BMI. n=33. Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD. \*p<0.05. \*\*p<0.01. t-Test**

Da der Glutathionstatus entscheidend durch die Aktivität des Enzyms Glutathionreduktase (GSR) bestimmt wird, wurde auch dieser Parameter im Arbeitskreis untersucht (relative GSR-Aktivität). Nach der Kaffeeintervention war die GSR-Aktivität im Vergleich zur ersten und zweiten Wash-out Phase signifikant erhöht (N. Böhm, persönliche Mitteilung); dies stimmt mit der zuvor gezeigten Modulation des GSH-Status in Vollblut (Abbildung 5-27) überein. Der Anstieg aller Glutathionbezogenen Parameter in der Kaffeephase verdeutlicht, dass der Studienkaffee im Organismus die Konzentration von reduziertem GSH erhöht und dass dies auf gesteigerte Glutathionsynthese sowie auf Verschiebung des GSH/GSSG-Verhältnisses zugunsten von GSH zurückzuführen ist.

#### 5.4.5 Einfluss unabhängiger Variablen auf die Messparameter

Mittels Varianzanalyse (ANOVA) wurde geprüft, wieweit die Messparameter (Zielvariablen) durch die unabhängigen Variablen Studienphasen, Probanden, Alter und BMI zur Studienbeginn beeinflusst wurden (Tabelle 5-5).

**Tabelle 5-5: Einfluss unabhängiger Variablen auf die Parameter. Varianzanalyse (ANOVA. Daten normal verteilt)**

Zielvariable (Parameter)	Unabhängiger Variable (Prädiktor)	p-Wert	Zielvariable (Parameter)	Unabhängiger Variable (Prädiktor)	p-Wert
Körpergewicht	Phasen <sup>a</sup>	< 0.01	DNA Gesamtschäden	Phasen <sup>a</sup>	< 0.0001
	Probanden <sup>a</sup>	< 0.0001		Probanden <sup>a</sup>	0.9
	BMI <sup>b</sup>	< 0.0001		BMI <sup>b</sup>	0.67
	Alter <sup>b</sup>	0.08		Alter <sup>b</sup>	0.82
Körperfett	Phasen <sup>a</sup>	< 0.01	tGSH	Phasen <sup>a</sup>	0.02
	Probanden <sup>a</sup>	< 0.0001		Probanden <sup>a</sup>	< 0.0001
	BMI <sup>b</sup>	< 0.0001		BMI <sup>b</sup>	< 0.0001
	Alter <sup>b</sup>	0.6		Alter <sup>b</sup>	0.99
Energieaufnahme (kcal)	Phasen <sup>a</sup>	< 0.01	GSR*	Phasen <sup>a</sup>	< 0.0001
	Probanden <sup>a</sup>	< 0.0001		Probanden <sup>a</sup>	< 0.0001
	BMI <sup>b</sup>	0.13		BMI <sup>b</sup>	0.1
	Alter <sup>b</sup>	0.1		Alter <sup>b</sup>	0.5

<sup>a</sup> Two-way ANOVA    <sup>b</sup> Three-way ANOVA

\* GSH Daten: persönliche Mitteilung N. Böhm

Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Einfluss der Studienphasen (auf alle untersuchten Parameter) und der Probanden (auf alle Parameter, außer DNA-Gesamtschäden). Der BMI beeinflusste signifikant das Körpergewicht, das Körperfett und den tGSH Spiegel. Das bedeutet je niedriger der BMI war, desto niedriger waren Körpergewicht und Körperfett und desto höher tGSH-Spiegel. Ein Einfluss des Alters der Probanden (20-44 Jahre) auf die Messparameter war dagegen nicht nachweisbar.

#### 5.4.6 Diskussion der Wirksamkeit des Studienkaffees

Zusammenfassend wurde in der zweiten Interventionsstudie eine antioxidative und gewichtsreduzierende Wirksamkeit eines Kaffees (*Coffea Arabica*) mit besonders hohem Gehalt an Antioxidantien beobachtet. Die Röstung der Kaffeebohnen war im Hinblick auf einen möglichst hohen Gehalt an Leitverbindungen Chlorogensäuren und N-Methylpyridinium (5-CQA-580 mg/ml und NMP 72 mg/ml) optimiert worden. Die vierwöchige Aufnahme des Studienkaffees zeigte eine signifikante Reduktion von Körpergewicht, BMI und Körperfett der Probanden im Vergleich zu der ersten Wash-out Phase, die in der nachfolgenden zweiten Wash-out Phase wieder aufgehoben wurde. Während der Kaffeeintervention wurde bei 76 % der Probanden eine

Gewichtsreduktion festgestellt, die vor allem bei den Probanden mit einem BMI < 25 ausgeprägt war. Der Körpergewichtsverlust korrelierte mit einer Abnahme des Körperfettgehaltes. Dies kann in Stoffwechselbeeinflussung bzw. -steigerung durch Kaffee und einem damit ausgelöstem erhöhtem Energieumsatz und/oder Beeinflussung der Sättigung begründet sein. Die koffeinabhängige Induktion von Thermogenese, Lypolyse und Fettoxidation in Geweben und daraus resultierenden Körpergewichtsreduktion bei Menschen ist in verschiedenen Publikationen beschrieben [Bidel *et al.*, 2008; Tunnicliffe and Shearer, 2008]. Im Kaffee in höheren Mengen vorkommende Chlorogensäuren tragen ebenfalls zur Gewichtsabnahme bei. Interventionsstudien mit Chlorogensäuren reichen Kaffees zeigten einen signifikanten Gewichtsverlust bei gesunden Probanden [Greenberg *et al.*, 2006; Thom, 2007]. Ob im Kaffee vorkommendes NMP einen Einfluss auf die Körpergewichtsreduktion hat, ist noch nicht bekannt. In der Pilotinterventionsstudie, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt wurde, wurde eine signifikante Gewichtsabnahme bei den Probanden durch NMP-reichen Kaffee beobachtet [AG Somoza, TU München, unveröffentlichte Daten].

Der Vergleich der Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden während der Studienphasen und nach Studienende zeigte für beide Parameter eine signifikante Verringerung in der Kaffeephase. Somit hatte geringere Energiezufuhr während des vierwöchigen Kaffeekonsums einen Einfluss auf die Gewichts- und – Körperfettreduktion. Außerdem könnte auch ein gesteigerter Grundumsatz zu der beobachteten Gewichtsreduktion beitragen.

In der zweiten Humanstudie wurde wie bei der vorausgehenden Pilotstudie (s.Kapitel 5.3), eine signifikante Abnahme der (oxidativen) DNA-Schäden nach dem Kaffeekonsum beobachtet. Dies kann in direkten antioxidativen Effekten der Kaffeeinhaltsstoffe (z.B. CQAs und NMP), wie dem Abfangen von ROS oder Chelatbildung mit Übergangsmetallen begründet sein. Ebenfalls dazu beitragen können eine erhöhte gesteigerte zelluläre Abwehr wie Induktion von ARE-abhängige Enzyme, Synthese von zellulären Antioxidantien (z.B. Glutathion) und/oder eine gesteigerte DNA-Reparatur-Aktivität. Eine kaffeeinduzierte Reduktion von Gesamt-DNA-Schäden bei Probanden wurde auch in anderen Studien beobachtet [Bichler *et al.*, 2007; Hoelzl *et al.*, 2009]. Eine Ursache für die Erhöhung des tGSH-Levels im Vollblut während der vierwöchigen Kaffeeaufnahme kann die Steigerung der Aktivität der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase ( $\gamma$ -GCL) sein, welches den geschwindigkeitsbestimmenden

Schritt der Glutathion-Synthese katalysiert (s. Kapitel 3.2.3.2). Eine von Esposito et al. beschriebene Interventionsstudie an Probanden zeigte eine Erhöhung der Gesamtglutathionspiegels in Plasma nach der Aufnahme von Espresso Kaffee [Esposito *et al.*, 2003].

Glutathion war der einzige Biomarker, der durch den BMI der Probanden beeinflusst wurde. Probanden mit niedrigem BMI zeigten einen erhöhten tGSH Spiegel. Eine derartige negative Korrelation ist in der Literatur bekannt [Charles *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2006]. Ein BMI-abhängiger Einfluss wurde bei DNA-Schäden jedoch nicht beobachtet, was auch mit Giovannelli et al. übereinstimmt.

## 6. Diskussion und Ausblick

Zahlreiche epidemiologische Studien geben Hinweise, dass Kaffeekonsum präventiv gegen verschiedene ROS-assoziierte Krankheiten wirksam ist [Hernan *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2006; van Dam, 2008]. Außerdem spielt Kaffee für den Energiestoffwechsel und die damit verbundene Gewichtsregulation eine große Rolle [Greenberg *et al.*, 2006; Thom, 2007]. Auf Grund der komplexen Matrix und Vielzahl der Inhaltsstoffe des Kaffees und seiner Wechselwirkungen im menschlichen Körper ist es schwer zu erfassen, welche Inhaltsstoffe dabei für diese Wirkungen maßgeblich verantwortlich sind. Diskutiert werden Chlorogensäuren als quantitativ dominierende phenolische Verbindungen im Kaffee [Bekedam *et al.*, 2008; Olthof *et al.*, 2001; Thom, 2007], aber auch N-Methylpyridinium (NMP), ein Abbauprodukt des im Kaffees natürlich vorkommenden Trigonellin, welches während der Röstung entsteht und als möglicher antioxidativer Kaffeeinhaltsstoff beschrieben wurde [Somoza *et al.*, 2003].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das antioxidative Potential ausgewählter Kaffeeextrakte, -inhaltsstoffe und Kaffeegetränke zu charakterisieren. *In vitro* wurde die antioxidative Aktivität von Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakte an den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und Caco-2 mittels Markern oxidativer Zellschädigung und Zellantwort erfasst. Bei den in der Arbeit eingesetzten Inhaltsstoffen handelte es sich um im Kaffee originär vorkommende Inhaltsstoffe 5-Caffeoylchinasäure (5-CQA), Trigonellin (TRIG) sowie deren während des Kaffeeröstens entstandenen Abbauprodukte wie Catechol, 1,2,4 Trihydroxybenzol (THB), Kaffeesäure, N-Methylpyridinium (NMP) und methylierte NMP-Analoga. Neben drei aus handelsüblichen, mittelstark gerösteten Kaffee hergestellten Extrakten Arabica Columbia (AC), Arabica Brazil (AB) und Robusta India (RI) wurden zusätzlich noch zwei aus stark geröstetem sowie aus schwach geröstetem Arabica Brasil gewonnene Extrakte (AB 1 und AB 2) untersucht. Die mittelstark gerösteten Kaffeeextrakte AB, AC und RI wiesen ähnliche Konzentrationen an den Leitsubstanzen Chlorogensäuren (Caffeoylchinasäuren, 69-97 mg/g CQAs) und N-Methylpyridinium (1,2-1,5 mg/g, NMP) auf; im Gegensatz dazu zeichneten sich AB 1 und AB 2 durch inverse Konzentrationen an CQAs (58,3 mg/g AB 1, 5,4 mg/g AB 2) und NMP (0,4 mg/g AB 1, 4,8 mg/g AB 2) aus. Weiterhin wurde in zwei aufeinander folgenden Humanstudien an Probanden die antioxidative Wirksamkeit unterschiedlicher Kaffees



charakterisiert, sowie in der zweiten Humanstudie zusätzlich eine körperrgewichtsregulierende Wirkung untersucht.

Die Wirksamkeit *in vitro* untersuchten Extrakten unterschied sich deutlich voneinander und ist in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

**Tabelle 6-1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeextrakten; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich in [µg/mL] sowie die maximale Wirkstärke. Ausnahme TEAC/ORAC [mM Trolox]. RI, AC, AB: mittelstark geröstete Extrakte; AB 1: leicht geröstete Extrakt; AB 2: stark geröstete Extrakt.**

Endpunkt			RI	AC	AB	AB 1	AB 2
direkte antiox. Aktivität	TEAC <sup>a</sup> mM Trolox		1,3	1,5	1,3	0,9	0,9
	ORAC <sup>a</sup> mM Trolox		2,8	2,5	2,7	2,6	2,5
zelluläre ROS-Level	DCF	oC <sup>b</sup>	50-100	50-100	50-100	1	5-100
	Assay	WS <sup>c</sup>	-18	-23	-21	-12	-23
Proteinexpression	NQO1	oC <sup>b</sup>	n.b	n.b	n.b	0,1-100	1
		WS <sup>c</sup>				+ 98	+ 26
	γ-GCL	oC <sup>b</sup>	n.b	n.b	n.b	1-100	----
		WS <sup>c</sup>				+ 48	
	GSR	oC <sup>b</sup>	n.b	n.b	n.b	10	----
		WS <sup>c</sup>				+ 23	

a) Konzentration einer Trolox-Lösung (mM) mit den gleichen antioxidativen Wirksamkeit wie eine Extraktlösung der Konzentration 1 mg/ml

b) oC: Konzentrationsbereich mit optimaler Wirkstärke, angegeben in [µg/ml]

c) WS: Wirkstärke: gibt an, um wieviel Prozent der Endpunkt im Vergleich zur Oxidans-Kontrolle (ROS-Level) bzw. Lösungsmittel-Kontrolle moduliert wurde

---: kein Effekt

n.b: nicht bestimmt

Die **zellfreie antioxidative Aktivität** wurde mit TEAC und ORAC Assays bestimmt, die auf zwei unterschiedlichen Reaktionsmechanismen beruhen. Während über den TEAC überwiegend ein Elektronentransfer (SET) bestimmt wird, wird durch den ORAC Assay ein Wasserstoff-Atom-Transfer (HAT) gemessen (s. Kapitel 3.7.7). Alle Extrakte zeigten eine deutliche zellfreie antioxidative Aktivität in beiden Systemen, wobei die Assays auf Grund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen unterschiedliche Werte zeigten. Die ORAC Werte aller geprüften Extrakte lagen in

einem ähnlichen Bereich; es zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Röststärken des Kaffees. Im Gegensatz dazu waren die TEAC-Werte der mittelstark gerösteten Kaffees höher als die der anderen Extrakte. In der Literatur wurde passend zu den hier vorgestellten Ergebnissen von der deutlichen zellfreien antioxidativen Aktivität der mittel gerösteten Extrakte berichtet [del Castillo *et al.*, 2002]. Der TBH-induzierte ROS Level in HT-29 Zellen wurde durch Inkubation mit den mittelstark gerösteten Extrakten reduziert. Noch deutlicher ausgeprägt war die Wirkung von stark geröstetem AB 2. Eine entgegengesetzte Wirkungsstärke zeigten die Extrakte bei Untersuchungen der Proteinexpression ARE-abhängiger Enzyme in HT-29 Zellen. Hier war der leicht geröstete AB 1 am effektivsten und induzierte alle untersuchten Enzyme (NQO1,  $\gamma$ -GCL, GSR) nach 24 h Inkubation. Über eine kaffeeabhängige *in vitro* Modulation der ARE-abhängige Enzyme liegen in der Literatur bisher noch keine Daten vor, jedoch wurde in einer Studie an Ratten nach Kaffeeaufnahme einen Anstieg der NQO1 und  $\gamma$ -GCL Transkription in Leber und Dünndarm beobachtet [Higgins *et al.*, 2008].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kaffeeextrakte in der Lage sind, oxidative Zellschäden zu reduzieren, wobei unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die direkte antioxidative Aktivität ist vor allem ein Kurzzeiteffekt, der ROS in der Zelle inaktivieren könnte. Durch Induktion der zellulären Abwehr könnte dagegen ein nachhaltiger Schutz der Zellen vor oxidativem Stress erreicht werden. Die beobachtete unterschiedliche antioxidative Wirksamkeit der Extrakte ist von Röstgrad und somit auch von der chemischen Zusammensetzung abhängig. Die in der Arbeit untersuchten Kaffeeextrakte unterschieden sich in den Konzentrationen an originären Kaffeeinhaltsstoffen (CQAs, TRIG) und Röstprodukten (NMP, methylierte NMP-Analoga). Um aufzuklären welche Inhaltsstoffe in besonderem Maß zur antioxidativen Wirksamkeit der Extrakte beitragen, wurden die ausgewählten Leitverbindungen auf ihre protektive Wirkung vergleichend untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6-2 zusammengefasst. Die phenolischen Kaffeeinhaltsstoffe 5-CQA und CA zeigten eine ausgeprägte zellfreie antioxidative Kapazität, dies wurde bereits in der Literatur für verschiedene extrazelluläre Testsysteme berichtet [Gomez-Ruiz *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2006a]. Die Abbauprodukte der Chlorogensäuren (THB und Catechol) wiesen leicht niedrigere TEAC und ORAC Werte als die Ausgangsverbindungen auf. Die Alkylpyridiniumverbindung Trigonellin und seine Abbauprodukte N-Methylpyridinium und methylierte NMP-Analoga waren

schwach bzw. nicht antioxidativ wirksam. Auf der Basis der TEAC/ORAC - Werte der Kaffeeinhaltsstoffe (bezogen auf 1mg/ml) und ihren Konzentrationen in den Extrakten wurde ihr Anteil an der antioxidativen Aktivität der Extrakte berechnet; Für der leicht geröstete AB 1 tragen die im Kaffee originär vorkommende Inhaltsstoffe 5-CQA, deren 3- und 4-CQA Isomere und TRIG zu ca. 50 % bei. Die beobachtete leicht höhere zellfreie antioxidative Aktivität der mittelgerösteten Extrakte (RI, AC, AB > AB 1, AB 2) ist vermutlich auf den Gehalt von originären Kaffeeinhaltsstoffen und Röstprodukten zurückzuführen. Für starkgerösteten AB 2 wurde durch die Röstprodukte NMP und CAT keinen Beitrag gefunden; somit scheinen andere während des Röstens entstandene Verbindungen wie z.B. Maillard-Produkte (Melanoidine [del Castillo *et al.*, 2005], Pyrazine) eine bedeutende Rolle für antioxidative Wirksamkeit von AB 2 zu spielen.

Der **zelluläre ROS-Level** wurde in HT-29 Zellen in besonderem Maße nur durch 5-CQA, in Übereinstimmung mit der Literatur [Schaefer *et al.*, 2006a] reduziert. Andere Inhaltsstoffe waren schwach (Cat, THB, Trigonellin) bzw. nicht (NMP) effektiv. Da die 5-CQA und andere Chlorogensäuren in höheren Konzentrationen in leicht geröstetem AB 1 vorkommen, könnten deren beobachtete Wirkungen diesen Verbindungen zugeschrieben werden. Ein wesentliche Beitrag von untersuchten Röstprodukten (NMP, NMP-Analoga, Cat, THB) zur ausgeprägten antioxidativen Wirksamkeit des stark gerösteten AB 2 ist unwahrscheinlich, da diese Verbindungen bezüglich Reduktion des ROS-Levels keine Effekte gezeigt haben. Somit lässt sich vermuten, dass für die ROS-modulierende Wirkung von AB 2 andere im Kaffee vorkommende Röstprodukte verantwortlich sind. Es wurde in der Literatur häufiger gezeigt, dass es bei verlängerter Röstung zu einer erheblichen Zunahme des antioxidativen Potentials von Kaffee kommt. Dabei wird die vermehrte Bildung von spezifischen Röstverbindungen, insbesondere von Melanoidinen für diese Wirkung verantwortlich gemacht [Daglia *et al.*, 2004; Delgado-Andrade *et al.*, 2005]. Welche Strukturen dabei hauptsächlich die antioxidativen Eigenschaften bedingen, ist bis heute nicht geklärt. Bei dem Biomarker „**DNA-Schäden**“ in Caco 2 Zellen waren die Röstprodukte NM-2MP und NM-3MP am stärksten antioxidativ wirksam.

**Tabelle 6-2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich in [ $\mu\text{g/mL}$ ] sowie die maximale Wirkstärke. Ausnahme TEAC/ORAC [ $\text{mM Trolox}$ ].**

Endpunkt	5-CQA	CA	CAT	THB	TRIG	NMP	NM-2MP	NM-3MP
<b>TEAC</b> <sup>a</sup> mM Trolox	1,3	1,3	0,9	1,1	0,5	0,4	n.n	n.n
<b>ORAC</b> <sup>a</sup> mM Trolox	3,5	3,9	3,4	1,9	n.n	n.n	n.n	n.n
<b>ROS-Level</b> oC <sup>b</sup>	3-30	---	30	30	100	---	---	---
<b>WS</b> <sup>c</sup>	- 50	---	- 20	- 10	- 10	---	---	---
<b>DNA-Schäden</b> oC	---	10-100	---	100	---	---	1-30	3-30
<b>WS</b>	---	-20	---	-10	---	---	- 40	- 30
<b>Proteinexpression</b>								
<b>NQO1</b> oC <sup>b</sup>	0,3-100	n.b	n.b	n.b	n.b	1	n.b	n.b
<b>WS</b> <sup>c</sup>	+ 100					+15		
<b><math>\gamma</math>-GCL</b> oC <sup>b</sup>	3-30	n.b	n.b	n.b	n.b	---	n-b	n.b
<b>WS</b> <sup>c</sup>	+ 30							
<b>GSR</b> oC <sup>b</sup>	0,3-1	n.b	n.b	n.b	n.b	---	n.b	n.b
<b>WS</b> <sup>c</sup>	+ 50							

a) Konzentration einer Trolox-Lösung (mM) mit den gleichen antioxidativen Wirksamkeit wie eine Lösung der Konzentration 1 mM Testsubstanz

b) oC: Konzentrationsbereich mit optimaler Wirkstärke, angegeben in [ $\mu\text{g/mL}$ ]

c) WS: Wirkstärke: gibt an, um wieviel Prozent der Endpunkt im Vergleich zur (Oxidans)-Kontrolle moduliert wurde

---: kein Effekt

n.b: nicht bestimmt

Die Auswirkung der ausgewählten Kaffeeinhaltsstoffe auf den Mechanismus der **Zellantwort** wurde in HT-29 Zellen untersucht. Während 5-CQA in allen geprüften Konzentrationen (0,3-100  $\mu\text{M}$ ) zu einer ausgeprägten und signifikanten Induktion der alle untersuchten Enzyme führte, kam es nach Inkubation mit dem NMP nur zu schwachen (NQO1) bzw. keinen ( $\gamma$ -GCL, GSR) Effekten. Ein Vergleich der Ergebnisse der Kaffeeextrakte und -inhaltsstoffe macht deutlich, dass die Leitverbindung 5-CQA wesentlich an der Wirkung der Extrakte beteiligt ist. In der Literatur wurde bereits von einer Erhöhung verschiedener ARE-regulierter Gene nach Inkubation mit Chlorogensäure berichtet [Feng *et al.*, 2005]. So konnte durch

unsere Projektpartner (AG Marko, Universität Karlsruhe) mittels PCR-Analyse eine Erhöhung der  $\gamma$ -GCL- Transkripte nach Inkubation der HT-29 Zellen mit 5-CQA gezeigt werden [Böttler, 2009]. 5-CQA scheint ein Induktor der verschiedenen ARE-abhängigen Enzyme zu sein, der durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zu einem Anschalten des Nrf2/ARE (EpRE)-Signalwegs führt. Zusammenfassend zeigten die *in vitro* Untersuchungen eine antioxidative Wirkung der Kaffeeextrakte. Ob diese beobachteten protektiven Eigenschaften sich auch im menschlichen Organismus nachweisen lassen, wurde in zwei aufeinander folgenden Humanstudien untersucht.

In einer ersten 12-wöchigen humanen Pilot-Interventionsstudie (durchgeführt bei DFA, Garching, AG Somoza) wurde die antioxidative Wirkung von zwei Kaffeegetränken im Rahmen dieser Arbeit mit dem Marker „DNA-Schäden“ im Vollblut der Probanden untersucht. Die Studienkaffees unterschieden sich in der Röstung und zeichneten sich entsprechend durch inverse Konzentrationen an Leitverbindungen CQAs und NMP aus. Nach vierwöchigem Konsum (500 ml Kaffee/Tag) des CQA-reichen AB 1 Kaffees (1606,5 mg/l CQAs) wurde eine hochsignifikante Abnahme der gesamt DNA-Schäden (mit FPG) im Vergleich zur vorausgehenden Wash-out Phase beobachtet. Der NMP-reiche AB 2 Kaffee (71,2 mg/l NMP) induzierte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Schäden im Vergleich zur nachfolgenden Wash-out Phase. Eine abschließende Bewertung der Wirksamkeit der AB 2 ist jedoch nicht möglich, da sich die zweiwöchigen wash-out Phasen als zu kurz erwiesen hatten. Die DNA-Strangbrüche (ohne FPG) wurden durch die Aufnahme beider Kaffees nicht beeinflusst. Somit lässt sich die beobachtete Abnahme der gesamt DNA-Schäden auf Verringerung oxidativer Schäden zurückführen.

In der zweiten Interventionsstudie (AG Eisenbrand, TU Kaiserslautern) wurde die antioxidative Wirksamkeit eines Kaffees (*Coffea Arabica*) mit besonders hohem Gehalt an originären Inhaltsstoffen und Röstprodukten an gesunden Probanden mit eine Body-Mass-Index zwischen 19 und 32 untersucht. Ergänzend wurde eine gewichtsreduzierende Eigenschaft des Kaffees geprüft. Die Röstung der Kaffeebohnen war daraufhin optimiert einen möglichst hohen Gehalt an Chlorogensäuren (580 mg/ml, CQAs) und an N-Methylpyridinium (71,7 mg/l) zu erreichen. In Tabelle 6-3 sind die Ergebnisse der zweiten Humanstudie kurz zusammengefasst. Dargestellt ist die Veränderung der untersuchten Biomarker/

Parameter in der vier wöchigen Kaffee-Phase (im Vergleich zur ersten Wash-out Phase) bzw. in der zweiten Wash-out-Phase (im Vergleich zur Kaffee-Phase).

**Tabelle 6-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie (33 Probanden) mit Kaffee (↗ = Erhöhung, ↔ = Kein Effekt, ↘ = Erniedrigung) <sup>1</sup>Magermasse; \* N. Böhm, persönliche Mitteilung; (Statistik: einseitig, gepaart t-Test, Wilcoxon Test). Studienphasen: vierwöchige Kaffee-Phase und je vierwöchige 1. und 2. Wash-out Phase**

Endpunkte	Studienkaffee	
	1.Wash-out/Kaffee-Phase	Kaffee-Phase/2. Wash-out
DNA-Grunds Schäden	↘ (p< 0,001)	↗ (p< 0,01)
DNA-Gesamtschäden	↘ (p<0,001)	↗ (p<0,001)
tGSH-Spiegel	↗ (p< 0,05)	↘ (p< 0,01)
GSSG-Spiegel	↘ (Trend, p> 0,05)	↗ (Trend, p> 0,05)
GSH-Status	↗ (Trend, p> 0,05)	↘ (Trend, p> 0,05)
GSR*	↗ (p< 0,01)	↘ (p< 0,01)
Körpergewicht	↘ (p< 0,01)	↗ (Trend, p> 0,05)
Körperfett	↘ (p< 0,05)	↗ (Trend, p> 0,05)
MAMA <sup>1</sup>	↔	↔
Körperwasser	↔	↔
Energieaufnahme	↘ (p< 0,001)	↗ (p< 0,05)
Kohlenhydrate	↘ (p< 0,01)	↗ (p< 0,01)
Fett	↘ (p< 0,001)	↗ (Trend, p> 0,05)
Eiweiß	↘ (p< 0,01)	↗ (Trend, p> 0,05)

Es konnte eine signifikante präventive Wirkung anhand der Marker (oxidative) **DNA-Schädigung** und **Glutathion** nachgewiesen werden. Sowohl DNA-Strangbrüche (ohne FPG) als auch Gesamtschäden (mit FPG) wurden signifikant erniedrigt und zeigten einen gleichsinnigen Verlauf. Ähnliche Ergebnisse wurden im Rahmen der ersten Pilotinterventionsstudie erhalten. In der Literatur wurden bisher wenige Angaben zum Einfluss von Kaffee auf DNA-Schäden an Menschen gemacht. In einer

von Bichler *et al.* (2007) durchgeführten Studie mit Kaffee (600 ml Kaffee/Tag, 5 Tage) an acht gesunden Probanden wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme der Gesamt DNA-Schäden (mit FPG) in einem challenge Assay ( $H_2O_2$  Behandlung der isolierten Lymphozyten) beobachtet [Bichler *et al.*, 2007].

Beim Biomarker **Glutathion** wurde ebenfalls eine signifikante protektive Wirkung des Kaffees beobachtet. Durch die Kaffeeintervention wurde ein Anstieg des tGSH – Levels ( $p < 0,05$ ) und des GSH-Status hervorgerufen, letzterer auch begründet durch eine Verringerung der GSSG- Konzentration. Eine ebenfalls signifikante Erhöhung des Plasma Glutathionspiegels wurde in einer von Esposito *et al.* (2003) durchgeführten Humanstudie mit Kaffee an gesunden Probanden gesehen [Esposito *et al.*, 2003]. In der Literatur wurde ebenfalls eine Erhöhung der tGSH und GSH-Status durch Fruchtsäfte beschrieben [Spormann *et al.*, 2008; Weisel *et al.*, 2006]. Reduziertes Glutathion besitzt ein sehr niedriges Redox-Potential und reagiert somit sehr sensibel auf Änderungen des Redox-Status der Zelle, womit es den wichtigsten zellulären antioxidativen Abwehrmechanismus darstellt. Über Enzyme des GSH-Metabolismus (GPx, GST) und der GSH-Synthese ( $\gamma$ -GCL, GSR) ist die antioxidative Abwehr in die Detoxifizierung von Xenobiotika und in die Regulation des ARE involviert [Moskaug *et al.*, 2005].

Interessant sind in Bezug auf den Biomarker Glutathion weitere Untersuchungen zur Aktivität der glutathionbezogenen Enzyme. Im Rahmen der zweiten Humanstudie wurde eine signifikante Steigerung der Glutathionreduktase (GSR)-Aktivität in der Kaffeephase nachgewiesen (N. Böhm, persönliche Mitteilung). Der Anstieg aller Glutathion-bezogenen Parameter (GSH-Spiegel, -Status und GSR-Aktivität) in der Kaffeephase verdeutlicht, dass der Studienkaffee im Organismus die GSH Konzentration und den GSH Status erhöht und dass dies auf gesteigerte Glutathionsynthese sowie auf Verschiebung des GSH/GSSG-Verhältnisses zugunsten von GSH zurückzuführen ist.

Neben dem antioxidative Potential zeigte der Studienkaffee eine gewichtsregulierende Wirkung. Im Verlauf der Kaffeeintervention kam es zu einer signifikanten Gewichtsabnahme, entsprechend ebenfalls einer signifikanten Körperfettabnahme. Insgesamt kam es bei 76% der Probanden zu einer Gewichtsreduktion, dieser Effekt wurde in der zweiten Wash-out Phase wieder aufgehoben. Die gleichzeitig erfassten Parameter Gesamtkörperwasser und Magermasse blieben unbeeinflusst. Es zeigte sich darüber hinaus, dass alle

Probanden (16) mit BMI < 25 Gewicht verloren haben. Die beobachtete Gewichtsreduktion bei den normalgewichtigen Personen ist auch in der Literatur beschrieben [Greenberg *et al.*, 2006]. Kaffee besitzt eine stoffwechselanregende Wirkung, welche auf den Koffeingehalt zurückgeführt wird. Tatsächlich besitzt Koffein eine zentralnervöse Wirkung, die zum einen auf einem Adenosinrezeptor-Antagonismus und zum anderen auf einer Hemmung von Phosphodiesterasen beruht. So kommt es durch die Aufnahme von mäßigen Mengen an Koffein zu einer Anregung des Stoffwechsels und zu einem Anstieg der Körpertemperatur (Thermogenese). Der von uns beobachtete BMI –abhängige Körpergewichtverlust ist durch kaffeeinduzierte Thermogenese möglich. Wie in verschiedener Literatur bereits berichtet wurde, ist nahrungsinduzierte Thermogenese bei übergewichtigen und adipösen Menschen geringer als bei normalgewichtigen [Steiniger, 1982]. Eine verlangsamte Lipolyse wurde bei den übergewichtigen Personen ebenfalls beobachtet [Greenberg *et al.*, 2006; Steiniger, 1982]. Ob das Koffein für die von uns beobachtete gewichtsreduzierende Wirkung des Studienkaffees verantwortlich ist oder andere im Kaffee vorkommende Inhaltsstoffe (CQAs und NMP) dazu beitragen, ist bisher noch nicht geklärt. In der Literatur wird ein möglicher Einfluss von Chlorogensäure auf die Körpergewichtsentwicklung diskutiert, der zum einen auf einer limitierten Glukose-Aufnahme im Darm und zum anderen auf der eingeschränkten Freisetzung der Glukose im Blutkreislauf beruht [Thom, 2007; Tunnicliffe and Shearer, 2008; Welsch *et al.*, 1989]. Inwieweit die Ernährung während der Studie auf die Entwicklung der Körperzusammensetzung der Probanden ein Einfluss hatte, wurde anhand durchgeführter Ernährungsprotokolle verfolgt. Die Energie- und Nährstoffaufnahme wurde in der Kaffeephase signifikant im Vergleich zur ersten Wash-out Phase verringert. Dies legt nahe, dass Kaffee bzw. Kaffeeinhaltsstoffe die Sättigungsregulation beeinflussen. Die niedrigere Energieaufnahme während der Kaffeeintervention korrelierte mit der Körpergewicht- und Körperfettreduktion.

Da Übergewicht mit verschiedenen degenerativen Krankheiten assoziiert wird, ist es von großem Interesse, inwieweit der BMI den antioxidativen Status der Körpers beeinflusst. Wie in der Literatur diskutiert [Charles *et al.*, 2008], wurde auch in der 2. Humanstudie bei normalgewichtige Probanden (BMI < 25) bereits vor der Kaffeeintervention eine erhöhter tGSH-Spiegel im Vergleich zu Probanden mit BMI > 25 beobachtet. Die durch Kaffee erzielte Erhöhung des tGSH-Spiegels war bei den normalgewichtigen Probanden ausgeprägter als bei den übergewichtigen.



**Zusammenfassend** konnten in dieser Arbeit antioxidative Eigenschaften der Kaffeeextrakte und -inhaltsstoffe *in vitro*, sowie gewichtsregulierende und antioxidative Wirksamkeit der Kaffeegetränke in Interventionsstudien an Probanden nachgewiesen werden. *In vitro* erhobene Daten zeigten eine deutliche antioxidative Wirkung der leicht, mittel und stark gerösteten Kaffeeextrakte. Dies ließ sich partiell auf die Zusammensetzung der Extrakte (Anwesenheit von originären Inhaltsstoffe und Röstprodukte) zurückführen, die vor allem von den Röstbedingungen der Kaffee abhängt. Es ist gelungen mit an antioxidantien reichen Kaffees die Körperzusammensetzung positiv zu verändern und oxidativen Stress in gesunden Probanden zu reduzieren. Somit scheint dieser Ansatz auch Erfolg versprechend für weitere Untersuchungen im Bezug auf Energiestoffwechsel sowie Hunger – Sättigungsregulation.

## 7. Zusammenfassung

Wissenschaftliche Studien deuten auf ein gesundheitsförderndes und gewichtsregulierendes Potential des Kaffees hin, welches vor allem mit dem hohen Gehalt an Antioxidantien in Verbindung gebracht wird. In dieser Arbeit wurden Kaffeeextrakte, -inhaltsstoffe sowie Kaffeegetränke hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirksamkeit untersucht.

*In-vitro* wurde die präventive Wirkung von Extrakten aus leicht (AB1), mittel (RI, AC, AB) und stark (AB 2) gerösteten Kaffees mit Markern oxidativer Zellschädigung und Zellantwort in den Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und Caco-2 charakterisiert. Vergleichend wurden die ausgewählten originären Kaffeeinhaltsstoffe 5-Caffeoylchinasäure (5-CQA) und Trigonellin (TRIG) sowie die Röstprodukte Kaffeesäure (CA), Catechol (Cat), 1,2,4-Trihydroxybenzol (THB), N-Methylpyridinium (NMP) und methylierte NMP-Analoga untersucht. Erfasste Parameter waren zellulärer ROS-Level, (oxidative) DNA-Schädigung und Proteinexpression der ARE-abhängigen Enzyme NQO1,  $\gamma$ -GCL und GSR. Zusätzlich wurde die direkte antioxidative Aktivität mittels TEAC- und ORAC-Assay gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine radikalabfangende Eigenschaft aller Kaffeeextrakte mit Werten von 0,9-1,5 mM Trolox (TEAC) bzw. 2,5-2,8 mM Trolox (ORAC). Der zelluläre ROS-Level wurde in HT-29 Zellen durch die Extrakte AB, AC, RI und stark gerösteten AB 2 signifikant verringert. Eine konzentrationsabhängige und signifikante Induktion ARE-abhängiger Enzyme (NQO1,  $\gamma$ -GCL und GSR) in HT-29 Zellen wurde durch den CQA-reichen AB 1 beobachtet, der NMP-reiche AB 2 war dagegen unwirksam. Von den untersuchten Kaffeeinhaltsstoffen zeigten nur die phenolischen Verbindungen 5-CQA und CA eine ausgeprägte zellfreie antioxidative Aktivität. Der zelluläre ROS-Level konnte durch 5-CQA verringert werden, dagegen waren methylierte NMP-Analoga in der Lage (oxidative) DNA-Schäden in Caco-2 Zellen zu reduzieren. 5-CQA induzierte wie leicht gerösteter AB 1 die Proteinexpression aller untersuchten Enzyme in HT-29 Zellen.

Weiterhin wurde in zwei aufeinander folgenden humanen Interventionsstudien das antioxidative Potential unterschiedlicher Kaffeegetränke mit hohem Anteil an Antioxidantien charakterisiert; in der zweiten Studie wurde zusätzlich auf gewichtsregulierende Wirkung des Studienkaffees geprüft. Im Rahmen der ersten Pilotstudie, durchgeführt durch AG. Somoza (DFA Garching) wurde die Modulation

von DNA-Schäden im Blut von Probanden nach Konsum zweier Kaffeegetränke erfasst, die reich an Chlorogensäuren oder an N-Methylpyridinium waren (Kaffeeconsum: 0,5 L pro Tag, 4 Wochen). Beide Kaffeegetränke bewirkten im Blut gesunder Probanden eine deutliche Abnahme oxidativer DNA-Schäden. In der zweiten Interventionsstudie nahmen 35 männliche Probanden nach einer vierwöchigen Wash-out Phase über vier Wochen täglich 750 ml eines Antioxidantien reichen Kaffees (580 mg/l CQAs; 71,7 mg/l NMP) auf, anschließend folgte eine vierwöchige Wash-out Phase. Zu Beginn der Studie und am Ende jeder Phase wurden Blutentnahmen zur Bestimmung der Biomarker (oxidative) DNA-Schäden, Glutathion (Gesamtglutathion tGSH, oxidiertes Glutathion GSSG) sowie Bioimpedanzanalysen zur Bestimmung der Körperzusammensetzung durchgeführt. Zusätzlich wurden Energie und Nährstoffaufnahme der Probanden erfasst.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme (oxidativer) DNA-Schäden ( $p < 0,001$ ), Anstieg des tGSH-Spiegels ( $p < 0,05$ ) und des GSH-Status (Trend) und eine Erniedrigung des GSSG-Spiegels. Weiterhin wurde eine signifikante Abnahme von Körpergewicht und Körperfett der Probanden während der Kaffeeintervention im Vergleich zur beiden Wash-out Phasen beobachtet, welche vor allem bei Probanden mit BMI  $< 25$  stärker ausgeprägt war. Die Verringerung der Energie- und Nährstoffaufnahme während der Kaffeephase weist auf eine Kaffeeabhängige beeinflussung der Sättigungsregulation hin.

Zusammenfassend besitzt der Antioxidantien reiche Studienkaffee ein eindeutiges Potential zur Verringerung oxidativer Zellschädigung sowie gewichtsregulierende Wirkung in gesunden Probanden. Aufgrund der von uns erhaltenen *in vitro* Daten kann die antioxidative Wirksamkeit zum Teil auf die untersuchten originären Kaffeeinhaltsstoffen (vor allem CQAs) und Röstprodukte zurückgeführt werden. Andere bisher nicht charakterisierte Substanzen/Stoffgruppen tragen vermutlich ebenfalls zu der beobachteten Wirkung bei.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO. 2003. Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 278:38360-38367.
- Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolfram S. 1996. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 81:943-955.
- Agullo G, Gamet L, Besson C, Demigne C, Remesy C. 1994. Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Lett* 87:55-63.
- Aherne SA, O'Brien NM. 1999. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr Cancer* 34:160-166.
- Aherne SA, O'Brien NM. 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med* 29:507-514.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.
- Albrecht S, Brandl, H., Adam, W. 1990. Chemilumineszenz-Reaktion. *Chemie in unserer Zeit* 24:227-238.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. 2006. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142:941-952.
- Arya M, Rao LJ. 2007. An impression of coffee carbohydrates. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:51-67.
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. 2000. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 48:5496-5500.
- Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG. 2009. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45:226-233.
- Banerjee D, Madhusoodanan UK, Sharanabasappa M, Ghosh S, Jacob J. 2003. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. *Clin Chim Acta* 337:147-152.
- Bartoli GM, Piccioni E, Agostara G, Calviello G, Palozza P. 1994. Different mechanisms of tert-butyl hydroperoxide-induced lethal injury in normal and tumor thymocytes. *Arch Biochem Biophys* 312:81-87.
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130:1910-1917.
- Becker BF. 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14:615-631.
- Bekedam EK, Schols HA, Van Boekel MA, Smit G. 2008. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. *J Agric Food Chem* 56:2055-2063.

- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2001. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Belitz HD, Grosch, W., Schieberle, P. 2005. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York ed.
- Bellion P, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C. 2009. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol Nutr Food Res* in press.
- Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ. 1995. Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16:93-99.
- Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5216-5220.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2003. Biochemie, 5th ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bianchet MA, Erdemli SB, Amzel LM. 2008. Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases. *Vitam Horm* 78:63-84.
- Bichler J, Cavin C, Simic T, Chakraborty A, Ferk F, Hoelzl C, Schulte-Hermann R, Kundi M, Haidinger G, Angelis K, Knasmüller S. 2007. Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem Toxicol* 45:1428-1436.
- Bidel S, Silventoinen K, Hu G, Lee DH, Kaprio J, Tuomilehto J. 2008. Coffee consumption, serum gamma-glutamyltransferase and risk of type II diabetes. *Eur J Clin Nutr* 62:178-185.
- Boatman RJ, English JC, Perry LG, Fiorica LA. 2000. Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms. *Chem Res Toxicol* 13:853-860.
- Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. 2001. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* 61:6120-6130.
- Böttler D. 2009. Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe als Aktivatoren des Nrf2/ARE (EpRE)-Signalwegs.
- Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. 2001. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:949-954.
- Calliste CA, Le Bail JC, Trouillas P, Pouget C, Habrioux G, Chulia AJ, Duroux JL. 2001. Chalcones: structural requirements for antioxidant, estrogenic and antiproliferative activities. *Anticancer Res* 21:3949-3956.
- Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med* 9:441-449.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 14:303-311.
- Cavin C, Marin-Kuan M, Langouet S, Bezencon C, Guignard G, Verguet C, Piguet D, Holzhauser D, Cornaz R, Schilter B. 2008. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol* 46:1239-1248.

- Charles LE, Burchfiel CM, Violanti JM, Fekedulegn D, Slaven JE, Browne RW, Hartley TA, Andrew ME. 2008. Adiposity measures and oxidative stress among police officers. *Obesity (Silver Spring)* 16:2489-2497.
- Chen S, Wu K, Knox R. 2000. Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2). *Free Radic Biol Med* 29:276-284.
- Chiou TJ, Tzeng WF. 2000. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* 154:75-84.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34.
- Collins AR. 2000. Measurement of oxidative DNA damage using the comet assay. In: Lunec J, Griffiths HR, editors. *Measuring in vivo oxidative damage: a practical approach*: John Wiley & Sons.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3:465-469.
- Collins AR, Dusinska M, Horska A. 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 48:611-614.
- Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. 2003. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 24:511-515.
- Cremin P, Kasim-Karakas S, Waterhouse AL. 2001. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 49:1747-1750.
- Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1:145-157.
- Czok G. 1976. [Metabolic effect of coffee and caffeine]. *Z Ernährungswiss* 15:109-112.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43:348-361.
- Daglia M, Racchi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G. 2004. In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 52:1700-1704.
- de Kok TM, van Breda SG, Manson MM. 2008. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr* 47 Suppl 2:51-59.
- Dedon PC, Plataras JP, Rouzer CA, Marnett LJ. 1998. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurinone adduct of deoxyguanosine by base propenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11113-11116.
- del Castillo MD, Ames JM, Gordon MH. 2002. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 50:3698-3703.
- del Castillo MD, Gordon MH, Ames JM. 2005. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *European Food Research and Technology* 221:471-477.
- Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Morales FJ. 2005. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J Agric Food Chem* 53:7832-7836.
- Delves PJ, Roitt IM. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49.

- Dierickx PJ. 1994. The influence of picolines on glutathione transferase activity and subunit composition in human liver derived Hep G2 cells. *Biochem Pharmacol* 48:1976-1978.
- Dietz BM, Kang YH, Liu G, Eggler AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, Bolton JL. 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* 18:1296-1305.
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1:S128-138.
- Dörner K. 2001. *Klinische Chemie und Hämatologie*, Georg-Thieme Verlag ed.
- DSMZ. 2004. Human and Animal Cell Line.
- Dupas C, Marsset Baglieri A, Ordonaud C, Tome D, Maillard MN. 2006. Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol Nutr Food Res* 50:1053-1060.
- DuPont MS, Bennett RN, Mellon FA, Williamson G. 2002. Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J Nutr* 132:172-175.
- Duthie SJ, Dobson VL. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 38:28-34.
- Dziedzica SaH, BJF. 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils *Food Chemistry* 14 45.
- Eggers R, Pietsch A. 2001. Technology I: Roasting coffee. *World Agriculture Series*:90-107.
- Eisenbrand G, Metzler M. 2005. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Weinheim: Wiley, VCH.
- Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ. 2005. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, 3 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Eisenbrand G, Schreier P. 2005. *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie*, 2.8 ed. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Ernster L. 1967. DT diaphorase. *Methods enzymol.* 10:309-317.
- Esposito F, Morisco F, Verde V, Ritieni A, Alezio A, Caporaso N, Fogliano V. 2003. Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 17:595-601.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339:37-59.
- Faller A, Schünke, M., 1999. *Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion*, Georg Thieme Verlag ed. Stuttgart - New York.
- Farah A, de Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem* 54:374-381.
- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. 2008. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 138:2309-2315.
- Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. 2005. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* 280:27888-27895.

- Frank J, Biesalski HK, Dominici S, Pompella A. 2000. The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells. *Histol Histopathol* 15:173-184.
- Gallagher EP, Kavanagh TJ, Eaton DL. 1994a. Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Meth. Toxicol.* 1B:349-366.
- Gallagher EP, Kavanagh TJ, Eaton DI. 1994b. Glutathione, oxidized Glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Methods in Toxicology* 1b:349-366.
- Gao K, Xu A, Krul C, Venema K, Liu Y, Niu Y, Lu J, Bensoussan L, Seeram NP, Heber D, Henning SM. 2006. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J Nutr* 136:52-57.
- Glaab V, Collins AR, Eisenbrand G, Janzowski C. 2001. DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat Res* 497:185-197.
- Gomez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. 2007. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem* 55:6962-6969.
- Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* 22:287-293.
- Gottwald W. 2000. Statistik für Anwender: Wiley-VCH-Verlag.
- Goya L, Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Bravo L, Morales FJ. 2007. Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol Nutr Food Res* 51:536-545.
- Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A. 2006. Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 84:682-693.
- Gupta B. 1973. Microdetermination Technique for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Irradiated Solutions. *Microchem J* 18:363-374.
- Halliwell B. 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476:107-112.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed: Oxford University Press.
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27:146-159.
- Henderson CJ, Sahraoui A, Wolf CR. 2000. Cytochrome P450s and chemoprevention. *Biochem Soc Trans* 28:42-46.
- Hernan MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ. 2002. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52:276-284.
- Higdon JV, Frei B. 2006. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:101-123.
- Higgins LG, Cavin C, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2008. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol* 226:328-337.
- Hirakawa N, Okauchi R, Miura Y, Yagasaki K. 2005. Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:653-658.



- Hoeijmakers JH. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
- Hoelzl C, Knasmüller S, Misik M, Collins A, Dusinska M, Nersesyan A. 2009. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends. *Mutat Res* 681:68-79.
- Horvathova K, Vachalkova A, Novotny L. 2001. Flavonoids as chemoprotective agents in civilization diseases. *Neoplasma* 48:435-441.
- Hwang YP, Yun HJ, Chun HK, Chung YC, Kim HK, Jeong MH, Yoon TR, Jeong HG. 2009. Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. *Chem Biol Interact* 181:366-376.
- Iba MM, Fung J, Giannone JV, Okey AB. 2000. Comparative induction of CYP1A1 expression by pyridine and its metabolites. *Arch Biochem Biophys* 378:299-310.
- Iba MM, Nguyen T, Fung J. 2002. CYP1A1 induction by pyridine and its metabolites in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 404:326-334.
- Jaiswal AK. 1991. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry* 30:10647-10653.
- Janero DR. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515-540.
- Janzowski C, Glaab V, Mueller C, Straesser U, Kamp HG, Eisenbrand G. 2003. Alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis* 18:465-470.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. 1996. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 24:1389-1394.
- Jones DJL, Lamb JH, Verschoyle RD, Howells LM, Butterworth M, Lim CK, Ferry D, Farmer PB, Gescher AJ. 2004. Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity. *British Journal of Cancer* 91:1213-1219.
- Kaffeeverband D. [www.kaffeeverband.de](http://www.kaffeeverband.de).
- Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, Lincke C, Dolman KM, Becker K, Schirmer RH, Gromer S, Roos D. 2007. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood* 109:3560-3566.
- Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6:R63-74.
- Karczewski JM, Peters JG, Noordhoek J. 1999. Quinone toxicity in DT-diaphorase-efficient and -deficient colon carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 57:27-37.
- Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 463:13-31.
- Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect* 106:375-384.
- Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD. 2003. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer* 3:321-329.

- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D. 2005. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 49:317-328.
- Keston AS, Brandt R. 1965. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *Anal Biochem* 11:1-5.
- Keum YS, Han YH, Liew C, Kim JH, Xu C, Yuan X, Shakarjian MP, Chong S, Kong AN. 2006. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. *Pharm Res* 23:2586-2594.
- Khan NI, Naz L, Yasmeen G. 2006. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci* 19:62-65.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF, Jr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1:289-295.
- Klotz LO, Patak P, Ale-Agha N, Buchczyk DP, Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H. 2002. 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res* 62:4922-4928.
- Kushner RF, Kunigk A, Alspaugh M, Andronis PT, Leitch CA, Schoeller DA. 1990. Validation of bioelectrical-impedance analysis as a measurement of change in body composition in obesity. *Am J Clin Nutr* 52:219-223.
- Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gomez JM, Heitmann BL, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, Schols AM, Pichard C. 2004a. Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 23:1226-1243.
- Kyle UG, Bosaeus I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Manuel Gomez J, Lilienthal Heitmann B, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirlich M, Scharfetter H, A MWJS, Pichard C. 2004b. Bioelectrical impedance analysis-part II: utilization in clinical practice. *Clin Nutr* 23:1430-1453.
- Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. 2006. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *Br J Nutr* 96:39-46.
- Lang R, Mueller C, Hofmann T. 2006. Development of a stable isotope dilution analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection for the quantitative analysis of di- and trihydroxybenzenes in foods and model systems. *J Agric Food Chem* 54:5755-5762.
- Lange K. 2001. Statistik Formelsammlung: Verlag Wissenschaftliche Scripten.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. 2002a. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. *J Agric Food Chem* 50:7220-7225.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. 2002b. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem* 50:3156-3160.
- Larsson SC, Bergkvist L, Giovannucci E, Wolk A. 2006. Coffee consumption and incidence of colorectal cancer in two prospective cohort studies of Swedish women and men. *Am J Epidemiol* 163:638-644.
- Laval J. 1996. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* 44:14-24.

- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.
- Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. 2005. Nrf2, a multi-organ protector? *Faseb J* 19:1061-1066.
- Lee JS, Surh YJ. 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 224:171-184.
- Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AE, Rietjens IM. 2001. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med* 31:869-881.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-357.
- Lindl T. 2000. *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. 2002. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 156:445-453.
- Liu RH, Sun J. 2003. Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *J Agric Food Chem* 51:1718-1723.
- Loft S, Poulsen HE. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74:297-312.
- Long LH, Halliwell B. 2001. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol* 335:181-190.
- Long LH, Halliwell B. 2009. Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 388:700-704.
- Long LH, Kirkland D, Whitwell J, Halliwell B. 2007. Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutat Res* 634:177-183.
- Lottspeich F. 1998. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag ed.
- Luttmann W, Bradtke K, Küpper M, Myrtek D. 2006. *Der Experimentator Immunologie*, 2 ed: Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Maier HG. 1984. Chemische Aspekte des Kaffees. *Chemie in unserer Zeit* 1:17-23.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424:83-95.
- Marquardt H, Schäfer S. 2004. *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16:577-586.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Meneghini R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23:783-792.

- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 26:107-116.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 84:407-412.
- Miura YH, Tomita I, Watanabe T, Hirayama T, Fukui S. 1998. Active oxygens generation by flavonoids. *Biol Pharm Bull* 21:93-96.
- Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. 1992. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 112:2-16.
- Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. 2007. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 137:2196-2201.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81:277S-283S.
- Muller C, Lang R, Hofmann T. 2006. Quantitative precursor studies on di- and trihydroxybenzene formation during coffee roasting using "in bean" model experiments and stable isotope dilution analysis. *J Agric Food Chem* 54:10086-10091.
- Murray M, Sefton RM, Martini R, Butler AM. 1997. Induction of cytochromes P450 2B and 2E1 in rat liver by isomeric picoline N-oxides. *Toxicol Lett* 93:195-203.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. 2005. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radic Biol Med* 38:527-534.
- Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65:1575-1582.
- Nakagawa Y, Shetlar MR, Wender SH. 1965. Urinary Products from Quercetin in Neomycin-Treated Rats. *Biochim Biophys Acta* 97:233-241.
- Nakamura A, Goto S. 1996. Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem (Tokyo)* 119:768-774.
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. 2002. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem* 50:5735-5741.
- Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. 2002. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 50:6211-6216.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:233-260.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220:403-409.
- Ogata S, Takeuchi M, Teradaira S, Yamamoto N, Iwata K, Okumura K, Taguchi H. 2002. Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:641-645.

- Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. 2003. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* 133:1806-1814.
- Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131:66-71.
- Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298.
- Ostrow JD, Jandl JH, Schmid R. 1962. The formation of bilirubin from hemoglobin in vivo. *J Clin Invest* 41:1628-1637.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49:4619-4626.
- Pacifici RE, Davies KJ. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37:166-180.
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. 1998. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299:379-389.
- Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, Bacon J, O'Leary KA, Kroon PA, Knutson L, Forsell P, Eriksson T, Lennernas H, Williamson G. 2003. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos* 31:805-813.
- Piccoli A, Rossi B, Pillon L, Bucciante G. 1994. A new method for monitoring body fluid variation by bioimpedance analysis: the RXc graph. *Kidney Int* 46:534-539.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-4302.
- Prochaska HJ, Talalay P. 1988. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 48:4776-4782.
- Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. 1996. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 24:634-642.
- Ramos S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52:507-526.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237.
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SK, Moore KP, Rice-Evans CA. 2004. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* 36:212-225.
- Richelle M, Tavazzi I, Offord E. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem* 49:3438-3442.

- Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* 129:77-97.
- Rota C, Chignell CF, Mason RP. 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med* 27:873-881.
- Rousset M. 1986. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-1040.
- Rydberg B, Johanson, K. J., (Ed.: C.F., F.). 1978. pp. 465-468.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650.
- Sachs G. 2003. *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*. Berlin: Springer-Verlag.
- Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I. 2001. Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology. *Cell Biol Toxicol* 17:301-317.
- Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C. 2006a. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 50:24-33.
- Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C. 2006b. Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 50:413-417.
- Schäfer S. 2006. Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in humanen Kolonzellen. In: Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schulz GE, Schirmer RH, Sachsenheimer W, Pai EF. 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* 273:120-124.
- Selmar D, Bytof G. 2008. Das Geheimnis eines guten Kaffees. *Biol. Unserer Zeit* 3:158-167.
- Selmar D., G. B. 2008. Das Geheimnis eines guten Kaffees. *Biol. Unserer Zeit* 3:158-167.
- Shearer J, Farah A, de Paulis T, Bracy DP, Pencek RR, Graham TE, Wasserman DH. 2003. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. *J Nutr* 133:3529-3532.
- Sies H. 1985. *Oxidative Stress*. London: Academic press.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91:31S-38S.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Somoza V, Lindenmeier M, Wenzel E, Frank O, Erbersdobler HF, Hofmann T. 2003. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J Agric Food Chem* 51:6861-6869.
- Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Eisenbrand G, Janzowski C. 2008. Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3372-3380.
- Staal GEJ, Visser J, Veeger C. 1969. Purification and Properties of Glutathione Reductase of Human Erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 185:39-&.

- Stadler RH, Varga N, Hau J, Vera FA, Welte DH. 2002a. Alkylpyridiniums. 1. Formation in model systems via thermal degradation of trigonelline. *J Agric Food Chem* 50:1192-1199.
- Stadler RH, Varga N, Milo C, Schilter B, Vera FA, Welte DH. 2002b. Alkylpyridiniums. 2. Isolation and quantification in roasted and ground coffees. *J Agric Food Chem* 50:1200-1206.
- Stein J, Jauch, KW. 2003. *Praxis Handbuch Klinische Ernährung und Infusionstherapie*, Springer ed.
- Steiniger J, Karst, H, Noack, R und Steglich, HD. 1982. Reduzierte nahrungsinduzierte Thermogenese bei Adipositas. *Die Nahrung* 26
- Stennert A, Maier HG. 1993. [Trigonelline in coffee. I. Comparison of thin layer chromatography with high-performance liquid chromatography. Simultaneous determination of caffeine]. *Z Lebensm Unters Forsch* 196:430-434.
- Stryer L. 1996. *Biochemie*, 4. Auflage ed: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sun JS, Tsuang YH, Huang WC, Chen LT, Hang YS, Lu FJ. 1997. Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts. *Cell Mol Life Sci* 53:967-976.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:748-755.
- Thom E. 2007. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *J Int Med Res* 35:900-908.
- Tomczak J. 2003. Die bioelektrische Impedanzanalyse BIA. F.I.T. Wissenschaftsmagazin der Deutschen Sporthochschule Köln:S. 34–40.
- Toroser D, Yarian CS, Orr WC, Sohal RS. 2006. Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation. *Biochim Biophys Acta* 1760:233-244.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Tunnicliffe JM, Shearer J. 2008. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:1290-1300.
- Valerio LG, Jr., Kepa JK, Pickwell GV, Quattrochi LC. 2001. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol Lett* 119:49-57.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*.
- van Dam RM. 2008. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:1269-1283.
- van Dam RM, Hu FB. 2005. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Jama* 294:97-104.
- van den Berg R, Haenenb GMM, van den Berga H, Aalt Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) next term assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry* 66:511-517.
- Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL. 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 45:164-174.

- Vormann J. 2009. Präventionsmedizinische Aspekte des Kaffeekonsums. Ärzte Merkblatt 1. Ausgabe.
- Wang H, Joseph JA. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27:612-616.
- Wang H, Joseph JA. 1999b. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27:612-616.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. 1999a. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod* 62:802.
- Watzl B, und Rechkemmer, G. 2001. Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* 48:413-416.
- Wei YH. 1998. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 22:55-67.
- Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rufer C, Johannes C, Janzowski C. 2006. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J* 1:388-397.
- Welsch CA, Lachance PA, Wasserman BP. 1989. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. *J Nutr* 119:1698-1704.
- Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans* 28:16-22.
- Wolff SP. 1994. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. *Meth. Enzymol.* 233:182-189.
- Worthington DJ, Rosemeyer MA. 1976. Glutathione Reductase from Human Erythrocytes - Catalytic Properties and Aggregation. *European Journal of Biochemistry* 67:231-238.
- Zhang W, Lopez-Garcia E, Li TY, Hu FB, van Dam RM. 2009. Coffee consumption and risk of cardiovascular diseases and all-cause mortality among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32:1043-1045.
- Zhao Z, Shin HS, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. 2008. 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 56:3863-3868.
- Zhu H, Bannenberg GL, Moldeus P, Shertzer HG. 1994. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Arch Toxicol* 68:582-587.
- Zweibaum A. 1991. Differentiation of Human Colon Cancer-Cells. *Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport* 218:27-37



## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 3-1 Beispiele für die Entstehung verschiedener ROS, Abwehrmechanismen und Schädigungen (grün: Entgiftung, rot: direkte Folgen von ROS-Reaktionen; modifiziert nach [Kelly <i>et al.</i> , 1998; Sies, 1985]; CAT: Katalase, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSR: Glutathion-Reduktase, SOD: Superoxid-Dismutase, CYP: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen.....	7
Abbildung 3-2 Beispiele für oxidierte Pyrimidine und Purine, nach [Meneghini, 1997].....	11
Abbildung 3-3: Modifikationen von Desoxyguanin durch OH-Radikale, nach [Halliwell and Gutteridge, 1999].....	11
Abbildung 3-4: Strukturen von MDA-DNA-Addukten, nach [Benamira <i>et al.</i> , 1995].....	12
Abbildung 3-5: Bildung von MDA und MDA-Addukten durch Reaktion von OH-Radikal mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, nach [Dedon <i>et al.</i> , 1998; Janero, 1990].....	13
Abbildung 3-6: Überblick über die LPO, nach [Kelly <i>et al.</i> , 1998]; LH: Fettsäure; R: reaktive Spezies; X: Molekül, mit dem LOO <sup>•</sup> abreagiert.....	14
Abbildung 3-7: Struktur von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG), nach [Halliwell and Gutteridge, 1999].....	16
Abbildung 3-8: schematische Darstellung der BER, nach [Christmann <i>et al.</i> , 2003].....	18
Abbildung 3-9: Mechanismus der ARE-vermittelten Genexpression modifiziert nach [Kensler <i>et al.</i> , 2003].....	20
Abbildung 3-10: Vorgeschlagene Induktion von Phase II Genexpression durch Polyphenole über ein ARE [Masella <i>et al.</i> , 2005].....	21
Abbildung 3-11: Ein und zwei Elektronen-Reduktionsreaktion modifiziert nach [Ross <i>et al.</i> , 2000].....	22
Abbildung 3-12: Regeneration des Glutathions durch die Glutathionreduktase.....	24
Abbildung 3-13: Struktur der GSR modifiziert nach [Schulz <i>et al.</i> , 1978].....	24
Abbildung 3-14: Reaktionsschema des Hämabbaus durch die Hämoxygenase und die Biliverdinreduktase modifiziert nach [Ryter <i>et al.</i> , 2006].....	25
Abbildung 3-15: a) Kaffeepflanze; b) Schnitt durch Kaffeefrucht, [Belitz, 2005].....	27
Abbildung 3-16: Chemische Struktur von Hydroxyzimtsäuren nach [Belitz, 2005].....	30
Abbildung 3-17: Metabolismus von Chlorogensäure modifiziert nach [Olthof <i>et al.</i> , 2001].....	33
Abbildung 3-18: Thermische syn-Eliminierung der Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) (1): Chinasäure (2), Pyrogallol (3), Hydroxyhydrochinon (4), Catechol (5), 4-Ethylcatechol (6), 4-Methylcatechol (7), 4-Allylcatechol (8); modifiziert nach [Muller <i>et al.</i> , 2006].....	34
Abbildung 3-19: antioxidative Wirkung eines Modellcatechols. der Angriff des Radikals R <sup>•</sup> führt zur Bildung des Semichinons. R <sup>1</sup> : Rest.....	35
Abbildung 3-20: Decarboxylierung und Demethylierung von Trigonellin zu N-Methylpyridinium (NMP) bzw. Nikotinsäure [modifiziert nach Stadler <i>et al.</i> , 2002a]......	40
Abbildung 3-21: Chemische Struktur des N-Methylpyridinium-Ions [Somoza <i>et al.</i> , 2003]......	40
Abbildung 3-22: Bildung der N-Methylpyridinium (durchgezogene Linie) und Nicotinsäure (gestrichelte Linie) aus Trigonellin in Abhängigkeit von der Temperatur. Angegeben ist die Prozentuale Umwandlung auf molarer Basis. Pyrolysedauer= 15 min, n=3 [Stadler <i>et al.</i> , 2002b].....	41
Abbildung 3-23: Entstehung von N-Methylpicolinium [modifiziert nach Stadler <i>et al.</i> , 2002a und b].....	42
Abbildung 3-24: Strukturformel von Menadion.....	49
Abbildung 3-25: Redox-Cycling von Menadion nach [Klotz <i>et al.</i> , 2002].....	49
Abbildung 3-26: Struktur von <i>tert</i> -Butylhydroperoxid.....	50
Abbildung 3-27: Durchführung des Comet Assays (schematische Darstellung).....	51
Abbildung 3-28: Beispiele für Kometen mit unterschiedlichem Schädigungsausmaß unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	52
Abbildung 3-29: Durchführung des Comet Assays zur Detektion von Gesamtschäden (schematische Darstellung).....	53
Abbildung 3-30: Reaktionen von DCFH zur fluoreszierenden Form DCF, nach [LeBel <i>et al.</i> , 1992].....	54
Abbildung 3-31: Schematische Darstellung der Reaktion von GSH mit DTNB.....	55
Abbildung 3-32: Derivatisierung von GSH durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin.....	56
Abbildung 3-33: Aufbau des Western Blots.....	57
Abbildung 3-34: Chemolumineszenz-Reaktion [Albrecht, 1990].....	58
Abbildung 3-35: Oxidation von ABTS.....	58
Abbildung 3-36: Inaktivierung der Peroxylradikale durch Fluorescein, modifiziert nach [Ou <i>et al.</i> , 2001].....	60
Abbildung 3-37: Xylenolorange.....	61
Abbildung 3-38: Bioimpedanzmessung.....	63
Abbildung 4-1: Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2000].....	69
Abbildung 4-2: Lage der Elektroden während der Messung der BIA.....	94
Abbildung 4-3: Studiendesign der Humanstudie.....	97
Abbildung 4-4: Erfassung der Nährstoffaufnahme während der Studie.....	99
Abbildung 5-1: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration in Medium für HT-29-Zellen (DMEM + 5% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin; zellfrei) nach 24h Inkubation mit Kaffeeextrakten. (n=1-2, Vierfachbestimmung: Mittelwert).....	111

Abbildung 5-2: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration in Medium für Caco-2 Zellen (DMEM/F12 + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin; zellfrei) nach 24h Inkubation mit Kaffeeextrakten mit/ohne Zugabe von 100 U/ml Kat. (n=1, Doppelbestimmung).....	112
Abbildung 5-3: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit den Kaffeeextrakten AB, AC, RI; mit /ohne Katalase; n=1-3, Vierfachbestimmung: Mittelwert und SD ..	113
Abbildung 5-4: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29-Zellen durch Inkubation mit Kaffeeextrakten (n=5, Mittelwert und SD); Signifikanz: **p<0,01, * p<0,05.....	114
Abbildung 5-5: Modulation des TBH-induzierten ROS-Levels in HT-29-Zellen durch Inkubation mit 5-CQA, NMP und Trigonellin (n=3-5, Mittelwert und SD); Signifikanz: * p<0,05 .....	115
Abbildung 5-6: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche (a) und Gesamt-DNA- Schäden (b) durch 24 h Inkubation mit 5-CQA, CA, Cat und THB. Mittelwert und SD aus n=3 unabhängigen Experimenten. Signifikanz: *p<0,05 .....	117
Abbildung 5-7: Modulation Md-induzierter DNA-Strangbrüche (a) und Gesamt-DNA- Schäden (b) durch 24h Inkubation mit Trigonellin, NMP, NM-2MP und NM-3MP. Mittelwert und SD aus n=3 unabhängigen Experimenten. Signifikanz: *p<0,05 .....	118
Abbildung 5-8: Korrelation zwischen CI der NQO1 (a) bzw. α-Tubulin (b), HT-29 Zellen .....	119
Abbildung 5-9: a) Modulation der NQO1- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 6h-Inkubation mit BHA; n=2, Mittelwert und SD; Primär-Antikörper: mouse monoclonal-anti-NQO1 (1:2000); Sekundär-Antikörper goat-anti-mouse (1:1000) b) Western Blots: BHA 5 - 500µM. Beladungskontrolle α-Tubulin; += Medium mit Katalase .....	120
Abbildung 5-10: Modulation der NQO1- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit a) AB 1 und AB 2 b) 5-CQA und NMP; (Zusatz 100 U/ml Katalase) 24h Inkubation: n=3 Mittelwert und SD; NQO1 Primär-Antikörper: mouse monoclonal-anti-NQO1 (1:2000); Sekundär-Antikörper goat-anti-mouse (1:1000); Beladungskontrolle: α-Tubulin; Signifikanz: * p<0,05 ** p<0,01 .....	121
Abbildung 5-11: Modulation der a) γ-GCL und b) GSR- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit AB 1 und AB 2(Zusatz100U/ml Katalase); γ-GCL Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti-γ-GCL (1:750); Sekundär-Antikörper goat-anti-rabbit (1:1000); GSR Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti GSR (1:750); Sekundär-Antikörper: goat anti rabbit ; Beladungskontrolle β-Aktin; n=3, Mittelwert und SD; Signifikanz: * p<0,05.....	122
Abbildung 5-12: Modulation der a) γ-GCL und b) GSR- Proteinexpression in HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation mit 5-CQA und NMP (Zusatz100U/ml Katalase); γ-GCL Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti-γ-GCL (1:750); Sekundär-Antikörper goat-anti-rabbit (1:1000); GSR Primär-Antikörper: rabbit polyclonal anti GSR (1:750); Sekundär-Antikörper: goat anti rabbit ; Beladungskontrolle β-Aktin; n=3, Mittelwert und SD; Signifikanz: * p<0,05.....	123
Abbildung 5-13: Design der Pilotinterventionsstudie. Blutentnahme; P: Probanden .....	127
Abbildung 5-14: Modulation der (oxidativen) DNA-Schäden bei Probanden (Signifikanz *** p<0,001. t-Test, Einseitig, gepaart).....	128
Abbildung 5-15: Modulation der spezifisch oxidativen DNA-Schäden bei Probanden (Signifikanz *** p<0,001. t-Test, Einseitig, gepaart) .....	129
Abbildung 5-16: Studiendesign ( P: Probanden, Untersuchungs-/Blutentnahmetermine) .....	130
Abbildung 5-17: Entwicklung von Körpergewicht und Körperfett der 33 Probanden während ersten Wash-out Phase, Kaffeephase und zweiten Wash-out Phase. Dargestellt ist die Differenz in kg zwischen Beginn und Ende der jeweiligen Phase: Mittelwerte und SD; Signifikanz: ** p<0,01, * p<0,05, t-Test, einseitig, gepaart.....	132
Abbildung 5-18: Individuelle Körpergewichtsentwicklung der 33 Probanden während der Kaffeephase in kg, geordnet nach steigendem BMI (19,3 – 34,0). dargestellt als Differenz: 2. Untersuchung minus 3. Untersuchung.....	133
Abbildung 5-19: Durchschnittliche tägliche Nährstoffaufnahme der 33 Probanden in den Studienphasen in %, bezogen auf D-A-CH (Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr von Deutschland, Österreich und Schweiz. 2000; modifiziert nach DGE, 2001; Altersgruppe 25-51 Jahre); Mittelwerte und SD; Unterschied zur vorausgehenden Phase: Signifikanz: *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05. Prüfung auf Normalverteilung; t-Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt). .....	134
Abbildung 5-20: Durchschnittliche tägliche Vitaminaufnahme der 33 Probanden in den Studienphasen in %, bezogen auf D-A-CH (Empfehlung für die tägliche wünschenswerte Nährstoffzufuhr von Deutschland, Österreich und Schweiz. 2000; modifiziert nach DGE, 2001; Altersgruppe 25-51 Jahre). Mittelwerte und SD.....	135
Abbildung 5-21: Veränderung der täglichen Energieaufnahme während der Kaffeephase (dokumentiert über 7 Tage), dargestellt als Differenz: Kaffeephase minus 1. Wash-out Phase. 33 Probanden. geordnet nach steigendem BMI (19,3 – 34,0); Signifikanz: p<0,001. bei der Gruppe mit BMI<25; p<0,01. bei der Gruppe mit BMI>25 .....	136
Abbildung 5-22: Veränderung der Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden in den Studienphasen; Dargestellt als Differenz in %, bezogen auf den Ausgangswert der jeweiligen Phasen; n=33, Mittelwert und SD.....	137
Abbildung 5-23: Modulation der (oxidativen) DNA-Schäden. n=33. Mittelwerte und SD. Signifikanz: ***p<0,001. ** p<0,01. * p<0,05. Prüfung auf Normalverteilung; t-Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).....	138

Abbildung 5-24: Modulation der spezifisch oxidativen DNA-Schäden. n=33. Mittelwerte und SD. Signifikanz: ***p<0,001. t- Test, einseitig, gepaart .....	138
Abbildung 5-25: DNA-Schäden (ohne/mit FPG) in Vollblut. Einzelwerte der 33 Probanden, sowie Mittelwert (Strich) über alle Probanden; n=1.....	139
Abbildung 5-26: Modulation des GSH- und GSSG-Spiegels in Vollblut in der Interventionsstudie n=33, Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD; Signifikanz: ** p<0,01, * p<0,05. Prüfung auf Normalverteilung; t- Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).....	140
Abbildung 5-27: GSH-Status in Vollblut, n=33, Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD; Signifikanz: ** p<0,01, * p<0,05. Prüfung auf Normalverteilung; t- Test, einseitig, gepaart (Daten normal verteilt) und Wilcoxon Test (Daten nicht normal verteilt).....	140
Abbildung 5-28: Modulation des GSH-Spiegels in Vollblut. Zeitlicher Verlauf der Einzelwerte, sowie Mittelwerte (Strich); n=33, Dreifachbestimmung.....	141
Abbildung 5-29: Modulation des GSH-Spiegels in Vollblut: Einfluss des BMI. n=33. Dreifachbestimmung. Mittelwerte und SD. *p<0.05. **p<0.01. t-Test .....	142
Tabelle 3-1: Beispiele für Enzyme, die ·O2- generieren, nach [Halliwell and Gutteridge, 1999]. .....	8
Tabelle 3-2: Geschätzte Halbwertszeiten einiger ROS, nach [Sies, 1991] .....	10
Tabelle 3-3: Zusammensetzung von Röstkaffee (mittlerer Röstgrad) [Belitz, 2005].....	28
Tabelle 3-4: Chlorogensäurezusammensetzung grüner Kaffeebohnen [Farah et al., 2006] .....	31
Tabelle 3-5: Zusammensetzung und Ausbeute der Kaffeeextrakte [persönliche Mitteilung TU München].	44
Tabelle 4-1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgel (1x) .....	85
Tabelle 4-2: Eingesetzte Primär- und sekundäntikörper.....	86
Tabelle 4-3: Hauskeeping Gene.....	87
Tabelle 4-4: Messbare Parameter des Maltron-Bioimpedanz-Analysegerätes BF-906.....	95
Tabelle 5-1: Zusammensetzung und zellfreie antioxidative Aktivität (TEAC, ORAC) der Extrakte .....	107
Tabelle 5-2: Korrelationskoeffizienten R der linearen Regression.....	108
Tabelle 5-3: TEAC- und ORAC-Werte von Kaffeeinhaltsstoffen .....	109
Tabelle 5-4: Körpergewicht. Körperfett und Magermasse der Probanden bei den vier Untersuchungsterminen; (n=33).....	131
Tabelle 5-5: Einfluss unabhängiger Variablen auf die Parameter. Varianzanalyse (ANOVA. Daten normal verteilt).....	143
Tabelle 6-1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeextrakten; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich in [µg/mL] sowie die maximale Wirkstärke. Ausnahme TEAC/ORAC [mM Trolox]. RI, AC, AB: mittelstark geröstete Extrakte; AB 1: leicht geröstete Extrakt; AB 2: stark geröstete Extrakt.....	147
Tabelle 6-2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen; angegeben ist der wirksame Konzentrationsbereich in [µg/mL] sowie die maximale Wirkstärke. Ausnahme TEAC/ORAC [mM Trolox]. .....	150
Tabelle 6-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interventionsstudie (33 Probanden) mit Kaffee (↗ = Erhöhung, ↔ = Kein Effekt, ↘ = Erniedrigung) <sup>1</sup> Magermasse; * N. Böhm, persönliche Mitteilung; (Statistik: einseitig, gepaart t-Test, Wilcoxon Test). Studienphasen: vierwöchige Kaffeephase und je vierwöchige 1. und 2. Wash-out Phase .....	152

## 10. Abkürzungsverzeichnis

### Liste der untersuchten Extrakte und Substanzen

AB	Arabica Brazil Extrakt
AB1	Chlorogensäure-reiche Arabica Brazil Extrakt
AB2	N-Methylpyridinium-reiche Arabica Brazil Extrakt
AC	Arabica Columbia Extrakt
RI	Robusta India Extrakt
CA	Kaffeesäure
CAT	Catechol
CQA	Caffeoylchinasäure
ChA	Chlorogensäure
BHA	Butylhydroxyanisol
NMP	N-Methylpyridinium Ion
NM-2MP	N-Methyl-2-Methylpyridinium Ion (Picolinium)
NM-3MP	N-Methyl-3-Methylpyridinium Ion (Picolinium)
THB	1,2,4-Trihydroxybenzol
TRIG	Trigonellin
Que	Quercetin

### Abkürzungen

AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin)-dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ACF	aberrant crypt foci
ADI	acceptable daily intake
AE	Apfelsaftextrakt
AKT/PKB	Proteinkinase B
Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APC	adenomatöse Polyposis coli
AS	Aminosäure
ARE	antioxidative response element
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under curve
BCA	Bichinolincarbonsäure
BER	base excision repair
BHT	Butylhydroxytoluol
BLU	Boehringer Light units
BMI	Body Mass Index

## Abkürzungen

---

BSA	bovine serum albumin
CA	Comet Assay
KAT	Katalase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX-2	Cyclooxygenase 2
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
CYP 450	Cytochrom-P450
DAD	Diodenarray-Detektor
DAPI	4.6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DA	Dalton
DCF	2'.7'-Dichlorofluorescein (oxidierte Form)
DCFH	2'.7'-Dichlorofluorescein (reduzierte Form)
DCFH-DA	2'.7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPPH	1.1-Diphenyl-2-picrylhydrazylradikal
DSB	Doppelstrangbruch
DTNB	5.5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E%	Entfärbung im Vergleich zur Kontrolle (TEAC)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
EGCG	Epigallocatechingallat
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
FAAD	Fas-associated death domain
FACE	Fast activated cell-based ELISA
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAP	familiars adematöses Polyposis-Syndrom
FaPy	2.6-Diamino-4-hydroxyformamidopyrimidin
FI%	fluorescence increase
FKS	Fötales Kälberserum
FPG	Formamindopyrimidin-DNA-Glykosylase
FOX	ferrous oxidation in xlenol orange
FRAP	ferric reducing ability of plasma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
$\gamma$ -GCL	$\gamma$ -Glutamylcystein-Ligase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GS·	Glutathion-Radikal
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathion (oxidiert)

## Abkürzungen

---

GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	hydrogen atom transfer
HEPES	2-[4-(-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
HPLC	High performance (pressure) liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettich Peroxidase
IC <sub>50</sub>	Inhibierende Konzentration 50%
Keap 1	kelch-like ECH-associated protein 1
LC/MS	liquid chromatography/ mass spectrometry
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Fettsäure
LMA	low melting agarose
LOOH	Fettsäurehydroperoxid
LPH	Laktat-Phloridzin-Hydrolase
LPO	Lipidperoxidation
LPx	Laktat-Peroxidase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
Md	Menadion
MDA	Malondialdehyd
MW	Mittelwert
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
NER	nucleotid excision repair
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NMA	normal melting Agarose
NQO1	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase)
Nrf2	(nuclear transcription factor erythroid 2p45. NF-E2) related factor 2
o-	ortho
OH	Hydroxy-Gruppe
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
8-OH-dG	8-Hydroxy-desoxyguanin
p-	para
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)
PAGE	Polyacrilamid-Gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate saline buffer
pH	Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKa	Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
R	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
ROS	reactive oxygen species. engl. für Reaktive Sauerstoffspezies

## Abkürzungen

---

rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
SE	standard error. engl. für Standardfehler
SGLT1	sodium dependent glucose transporter
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhosamin B
SSA	Sulfosalicylsäure
SSB	single strand break. engl. für Einzelstrangbruch
STABW	Standardabweichung
SULT	Phenol-Sulfattransferase
TAC	total antioxidant capacity
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBS	tris buffered saline
TEAC	Trolox equivalent antioxidative capacity
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
tGSH	Gesamtglutathion
TI%	Tail intensity. engl. für Schweifintensität
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoat
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRAP	total peroxy radical trapping potential
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
UDPGT	UDP-Glucuronyl-Transferase
UDP	Uracil-Diphosphat

## 11. Anhang

### 11.1 In vitro Daten

ORAC [mM Trolox]	1.Messung	2.Messung	3. Messung	4. Messung	MITTELWERT
AC	2,38	2,37	2,73	2,63	2,53
RI	2,83	2,77	2,74	2,71	2,76
AB	2,44	2,89	2,88		2,74
AB 1	2,02	2,86	2,85		2,57
AB 2	2,33	2,59	2,54		2,49
5-CQA	3,48	3,58	3,44		3,50
CA	4,06	3,68	3,93	3,73	3,85
Catechol	3,34	3,42	3,30		3,36
THB	1,96	1,89	1,65		1,84
Trigonellin	0,04				
NMP	-0,27				
Trolox	1,00				

TEAC [mM Trolox]	1.Messung	2.Messung	3.Messung	4.Messung	Mittelwert
AC	1,86	1,18			1,52
RI	1,3	1,26			1,28
AB	1,19	1,2	1,15	1,25	1,20
AB 1	0,97	1,15	0,63	0,77	0,88
AB 2	0,93	0,99	0,48	0,77	0,79
5-CQA	1,2	1,38	1,2		1,26
CA	1,48	1,02	1,3		1,27
THB	1,06	1,33	1,02		1,14
Cat	0,89	0,9			0,90
Trigonellin	0,46	0,5			0,48
NMP	0,35	0,4			0,38
Picoliniums	n.n	n.n			



## Western Blot, HT-29 Zellen

<b>NQO1</b>							
<b>NMP [µM]</b>							
	K-	0,3	1	3	10	30	100
Bezogen auf K	100,0	63,9	136,4	90,9		106,2	121,8
	100,0	63,8	137,3	90,4		106,0	121,5
	100,0	37,2	122,6	98,4	153,2	141,1	145,2
	100,0	97,9	143,5	110,5	134,6	113,6	104,7
	100,0	54,9	107,0	126,3	83,4		
	100,0		100,0	93,4	118,2	102,3	98,8
	100,0	90,9	161,6	116,7	130,8	110,1	
	100,0	91,7		117,5	109,2	82,6	60,6
Mittelwert		71,5	129,8	105,5	121,6	108,8	108,8
SD		22,55	21,44	13,97	23,99	17,39	28,61
<b>5-CQA [µM]</b>	K-	0,3	1	3	10	30	100
Bezogen auf K	100	115	148,3	152,6	197,4	190,5	96,6
	100	110	216,7	140,0	163,3	155,0	200,0
	100	140	146,8	208,1	243,5	139,7	141,5
Mittel		121,7	170,6	166,9	201,4	161,7	146,0
SD		16,1	39,9	36,2	40,3	26,1	51,9
<b>AB 1 [µg/ml]</b>	K-	0,1	1	10	100		
Bezogen auf K	100	69,7	118,4	118,4	113,2		
	100	167,7	170,8	197,7	326,9		
	100	157,5	181,3	280,0	267,5		
MITTEL		131,6	156,8	198,7	235,9		
SD		53,9	33,7	80,8	110,3		
<b>AB 2 [µg/ml]</b>	K-	0,1	1	10	100		
Bezogen auf K	100	84,9	118,0	137,4	79,9		
	100	102,4	127,2	86,4	116,8		
	100	100,0	91,7	85,0	153,3		
	100	160,0	167,8	181,1	111,1		
	Mittel	111,8	126,2	122,5	115,3		
	SD	33,0	31,6	46,1	30,1		

## Western Blot, HT-29 Zellen

γ-GCL							
<b>5-CQA [μM]</b>		0,3	1	3	10	30	100
bezogeb auf K	100	99	102,2	100,5	102,2	99,5	100
	100	91	137,5	190,5	210,1	211,4	183,4
	100	107,1	122	122	116,1	117,2	83,2
Mittel	100	99,0	120,6	137,7	142,8	142,7	122,2
SD	0	6,6	14,4	38,4	47,9	49,1	43,8
<b>NMP [μM]</b>		0,3	1	3	10	30	100
bezogen auf K	100	125,6	137,9	151,3	107,9	94,6	83,1
	100	107,0	83,3	99,1	90,4	125,4	97,5
	100	116,1	114,3	118,8	105,4	95,5	83,1
	100	119,8	85,1		85,1	100,8	
	100	115,0	127,5	106,5	102,5	100,0	87,0
Mittel	100	116,7	109,6	118,9	98,3	103,3	87,7
SD		6,8	24,7	23,0	10,0	12,7	6,8
<b>AB 1 [μg/ml]</b>		0,1	1,0	10	100,0		
Bezogen auf K	100	102,9	70,7	98,6	85,1		
	100	95,7	135,2	205,8	182,7		
	100	124,4	128,7	136,0	119,5		
	100	115,9	124,2	155,1	144,1		
Mittel	100	109,7	114,7	148,8	132,8		
SD	0	11,1	25,7	38,6	35,6		
<b>AB 2 [μg/ml]</b>		0,1	1,0	10	100,0		
Bezogen auf K	100	107,2	73,4	100,0	88,4		
	100	55,8	109,6	72,5	70,8		
	100	98,2	93,5	89,7	93,5		
	100	105,8	107,7	96,8	101,6		
	100	53,2	108,0	71,3	121,9		
	100	98,2	93,5	89,7	93,5		
Mittel	100	86,4	97,6	86,7	94,9		
SD	0	22,82	12,74	11,07	15,31		

## Western Blot, HT-29 Zellen

<b>GSR</b>							
<b>5-CQA [<math>\mu</math>M]</b>		0,3	1	3	10	30	100
Bezogen auf K	100	116,5	102,1	93,8	109,1	31,7	87,7
	100	148,7	190,5	101,6	70,8	122,3	67,6
	100	156,1	173,1	106,9	71,0	129,8	74,5
Mittel	100	140,4	155,2	100,8	83,6	94,6	76,6
SD	0	17,2	38,2	5,4	18,0	44,6	8,3
<b>NMP [<math>\mu</math>M]</b>							
Bezogen auf K	100	101,3	85,8	76,5	84,4	82,3	47,1
	100	177,3	109,6	104,8	205,3	162,5	84,3
	100	150,0	104,5	92,0	100,6	76,7	57,5
Mittel	100	142,9	100,0	91,1	130,1	107,2	62,9
SD	0	31,4	10,3	11,6	53,6	39,2	15,7
<b>AB1 [<math>\mu</math>g/ml]</b>		0,1	1,0	10	100,0		
Bezogen auf K	100	151,92	82,19	134,00	138,19		
	100	94,13	96,28	111,11	101,37		
	100	128,68	97,22	124,64	118,56		
Mittel	100	124,91	91,90	123,25	119,37		
SD		23,7	6,9	9,4	15,0		
<b>AB2 [<math>\mu</math>g/ml]</b>		0,1	1,0	10	100,0		
Bezogen auf K	100	89,2	76,3	50,1	51,2		
	100	113,2	94,8	92,3	80,0		
	100	93,8	138,9	74,2	78,1		
Mittel	100	98,7	103,3	72,2	69,8		
SD		12,7	32,1	21,2	16,1		

## DCF Assay (HT-29 Zellen)

<b>5-CQA</b>	1	3	10	30	100
	97	86	33	53	121
	75	27	96	69	102
	80	40	78	18	26
Mittel	84	51	69	47	83
SD	11,5	31,0	32,4	26,1	50,3
<b>NMP</b>	1	3	10	30	100
	159	106	133	121	125
	100	120	125	124	155
	98	122	86	61	157
	93	104	104	116	82
			103	88	124
					93
Mittel	112,5	113	110,2	102	122,6
SD	31,14	9,31	18,81	27,01	30,87

### DCF-Assay DCF Assay (HT-29 Zellen)

<b>Cat</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>100</b>
	112	116	103	88	88
	92	71	87	70	90
	145	121	136	83	109
Mittelwert	116,3	102,7	108,7	80,3	95,7
SD	26,8	27,5	25,0	9,3	11,6
<b>THB</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>100</b>
	113	109	115	94	102
	90	100	85	84	83
	116	135	134	88	132
Mittel	106,3	114,7	111,3	88,7	105,7
SD	14,2	18,2	24,7	5,0	24,7
<b>TRIG</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>100</b>
	99	92	111	102	67
	90	101	81	76	89
	89	98	93	78	75
Mittel	92,7	97,0	95,0	85,3	77,0
SD	5,5	4,6	15,1	14,5	11,1

### DCF Assay (HT-29 Zellen)

<b>AB</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
	110	98	95	100	98	95
	95	95	88	89	75	90
			90	79	92	68
			35	32	39	74
			95	94	98	
Mittel	102,5	96,5	80,6	78,8	80,4	81,75
SD	10,6	1,5	11,48303	12,1959	11,17408	12,8
<b>AC</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
	98	100	94	91	98	85
	93	92	96	83	88	89
			91	79	90	84
			41	41	35	76
			104	89	85	
Mittel	95,5	96	85,2	76,6	79,2	83,5
SD	3,5	4	11,25789	9,15205	11,25789	5,4
<b>RI</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
	97	95	100	97	81	80
	98	111	96	88	85	79
			120	108	114	94
			36	37	30	
			92	80	78	75
Mittel	97,5	103	88,8	82	77,6	82
SD	0,7	8	14,05133	12,17785	13,52257	8,2

## DCF Assay (HT-29 Zellen)

<b>AB 1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
	100	109	105	110	100	125
	85	89	95	92	87	80
	84	91	96	93	84	104
	86	90	96	93	88	80
	85	90	97	98	89	80
	93	93	99	91	102	99
Mittel	88,8	93,7	98,0	96,2	91,7	94,7
SD	6,4	7,6	3,7	7,2	7,4	18,3
<b>AB 2</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>250</b>
	103	91	76	94	102	87
	82	82	81	81	84	82
	87	77	64	79	85	87
	83	83	82	82	85	81
	80	78	82	85	78	89
Mittel	87	82,2	77	84,2	86,8	85,2
SD	9,3	5,5	7,7	5,9	9,0	3,5

## 11.2 Probandendaten

### Pilotinterventionsstudie, Comet Assay

	Grunds Schäden	Grunds Schäden	Grunds Schäden	Grunds Schäden	Grunds Schäden
Probanden	1.BE	2.BE	3.BE	4.BE	5.BE
1	0,99	1,01	1,36	1,18	1,01
2	1,22	1,19	2,02	1,10	0,84
3	1,23	0,88	0,70	1,10	1,30
4	1,46	0,99	0,92	0,85	1,25
5	1,34	1,15	1,11	0,85	1,32
6	1,43	1,17	1,10	1,20	0,72
9	1,48	0,82	1,52	1,75	1,63
11	1,52	0,97	0,72	1,00	1,07
13	1,47	1,15	1,29	0,57	0,80
14	1,23	0,96	1,01	1,11	0,87
18	1,41	0,99	1,19	1,21	0,94
19	1,38	1,09	1,24	0,95	1,22
20	1,06	0,82	1,38	1,14	0,88
21	1,18	1,03	1,08	1,10	0,83
22	2,10	0,99	0,65	1,95	0,92
23	1,43	0,78	1,16	1,11	1,23
24	1,22	0,94	0,82	0,83	1,37
32	1,52	1,12	2,24	1,51	1,64
37	0,88	0,92	1,62	1,30	1,85
38	1,26	1,12	1,37	0,74	2,32
39	1,15	1,17	1,30	0,66	0,87
40	1,04	1	1,45	0,96	0,98
41	1,17	1	0,58	0,68	1,16
42	1,22	1,08	0,99	1,00	1,33
44	1,15	0,99	0,90	0,82	0,78
45	1,17	1,15	1,11	0,93	0,96
46	1,28	1,18	0,70	1,74	0,77
Mittelwert	1,30	1,02	1,17	1,08	1,14
SD	0,23	0,12	0,39	0,34	0,38
	Gesamtschäden	Gesamtschäden	Gesamtschäden	Gesamtschäden	Gesamtschäden
Probanden	1.BE	2.BE	3.BE	4.BE	5.BE
1	3,31	3,10	3,15	4,15	3,17
2	3,6	4,20	3,80	3,95	4,10
3	3,55	3,75	2,85	3,45	2,88
4	5,33	4,10	2,75	2,65	2,78
5	3,62	4,09	3,22	3,04	3,10
6	5,33	3,95	2,85	2,45	2,80
9	5,09	4,24	3,20	2,35	3,20
11	5,57	4,26	3,30	2,75	3,30

13	4,95	3,94	3,47	2,90	2,52
14	4,18	5,15	2,45	3,10	2,85
18	5,06	4,65	3,06	2,70	2,26
19	4,49	3,38	3,56	5,95	1,80
20	4,43	3,06	2,58	2,79	2,03
21	3,94	3,64	2,84	2,95	2,36
22	5,16	4,30	2,02	3,19	2,87
23	4,77	4,00	3,15	2,50	3,15
24	3,16	3,08	3,55	2,79	3,55
32	4,49	4,20	4,39	3,88	4,50
37	5,01	3,16	3,85	2,62	3,89
38	4,27	2,77	2,94	3,10	2,82
39	2,87	3,66	3,64	3,10	3,60
40	4,34	4,75	3,60	3,14	2,22
41	4,32	3,85	2,74	2,52	2,27
42	3,16	4,05	2,69	2,90	2,23
44	3,89	3,75	2,83	2,74	2,46
45	4,98	4,10	2,15	3,20	2,25
46	3,99	3,85	2,48	4,30	2,74
Mittelwert	4,33	3,89	3,08	3,15	2,88
SD	0,8	0,6	0,5	0,8	0,7

## 2. Humanstudie, Comet Assay (DNA-Schäden)

	Grundschiiden	SD	Grundschiiden	SD	Grundschiiden	SD	Grundschiiden	SD
Probanden	1.BE		2.BE		3.BE		4.BE	
1	1,14	0,26	0,95	0,04	0,53	0,12	0,76	0,07
2	1,38	0,12	1,14	0,02	0,92	0,27	1,02	0,06
3	0,91	0,34	1,04	0,10	0,70	0,06	0,76	0,12
4	1,07	0,02	1,01	0,09	0,74	0,34	0,52	0,04
5	0,86	0,07	1,09	0,33	0,73	0,06	0,86	0,33
6	0,47	0,02	0,89	0,06	0,86	0,06	0,78	0,00
7	0,49	0,10	1,43	0,15	1,04	0,00	0,87	0,05
8	0,54	0,11	1,46	0,46	0,69	0,09	0,69	0,05
9	1,12	0,11	2,93	0,52	0,70	0,09	0,55	0,13
10	0,95	0,09	1,16	0,24	0,82	0,26	0,67	0,27
11	0,67	0,07	0,92	0,04	0,40	0,03	0,66	0,06
12	0,53	0,01	0,98	0,29	0,51	0,14	0,52	0,15
14	1,17	0,10	1,46	0,13	0,81	0,05	0,94	0,03
15	0,77	0,09	1,16	0,30	0,59	0,02	0,99	0,15
16	0,73	0,09	0,97	0,27	0,93	0,15	1,05	0,17
17	0,67	0,12	1,02	0,21	0,94	0,10	1,14	0,07
18	0,90	0,18	0,94	0,12	0,88	0,43	0,83	0,04
19	0,79	0,00	1,04	0,03	0,21	0,01	0,87	0,00
20	0,91	0,25	1,11	0,04	0,45	0,08	0,94	0,09
21	1,31	0,07	1,64	0,34	0,60	0,12	0,75	0,07
22	0,79	0,00	1,44	0,34	1,44	0,34	0,67	0,09
23	0,77	0,11	1,20	0,10	0,72	0,13	0,82	0,08
24	0,76	0,11	1,29	0,09	0,65	0,15	0,71	0,33
26	1,14	0,14	1,05	0,01	0,76	0,19	1,27	0,86
27	0,88	0,23	0,96	0,25	0,63	0,05	0,81	0,00
28	0,85	0,34	1,09	0,01	0,62	0,08	0,79	0,17
29	0,83	0,09	0,89	0,03	0,79	0,03	0,91	0,19
30	1,94	0,00	1,38	0,10	0,57	0,53	1,04	0,03
31	0,90	0,18	1,23	0,09	0,64	0,01	1,18	0,02



<b>32</b>	0,73	0,18	0,79	0,04	0,81	0,09	1,00	0,17
<b>33</b>	0,64	0,13	0,95	0,18	0,51	0,00	0,89	0,24
<b>34</b>	0,72	0,14	0,89	0,01	0,83	0,00	0,84	0,04
<b>35</b>	0,95	0,03	1,28	0,00	0,83	0,32	0,93	0,11
<b>MITTELWERT</b>	<b>0,89</b>	0,12	<b>1,18</b>	0,15	<b>0,72</b>	0,13	<b>0,85</b>	0,13
	<b>Gesamtschäden</b>	<b>SD</b>	<b>Gesamtschäden</b>	<b>SD.</b>	<b>Gesamtschäden</b>	<b>SD</b>	<b>Gesamtschäden</b>	<b>SD</b>
<b>Probanden</b>	<b>1.BE</b>		<b>2.BE</b>		<b>3.BE</b>		<b>4.BE</b>	
<b>1</b>	4,12	1,70	4,95	0,42	2,21	0,10	4,38	0,00
<b>2</b>	3,16	0,65	4,95	0,52	3,42	0,58	4,22	0,91
<b>3</b>	3,43	0,77	5,17	0,60	3,30	0,10	3,73	0,71
<b>4</b>	3,17	0,00	6,21	0,38	3,22	0,30	3,96	0,60
<b>5</b>	5,38	2,33	5,85	1,99	3,90	0,54	5,02	1,21
<b>6</b>	1,32	0,18	6,20	1,28	4,03	0,05	3,57	0,35
<b>7</b>	2,50	0,16	7,76	0,00	3,14	0,08	3,23	0,51
<b>8</b>	1,17	0,04	7,73	0,62	5,60	0,28	4,63	0,81
<b>9</b>	3,14	0,09	3,62	0,29	3,59	0,78	3,83	0,34
<b>10</b>	2,95	0,88	9,50	0,71	3,54	0,17	2,72	0,04
<b>11</b>	3,27	0,41	3,83	0,80	2,63	0,16	2,85	0,01
<b>12</b>	3,72	0,42	4,54	0,12	2,23	0,06	3,00	0,24
<b>14</b>	4,10	0,00	4,20	1,02	2,74	0,11	3,89	0,02
<b>15</b>	3,95	0,07	3,94	0,18	2,68	0,09	3,88	0,21
<b>16</b>	2,70	0,05	5,55	0,24	3,20	0,05	3,43	0,13
<b>17</b>	5,40	1,78	7,63	0,16	2,78	0,32	3,46	0,30
<b>18</b>	3,16	0,76	9,00	1,35	3,81	0,54	3,20	0,54
<b>19</b>	4,18	0,51	7,72	0,83	2,28	0,01	2,89	0,18
<b>20</b>	5,61	0,00	4,04	0,34	2,48	0,47	3,20	0,41
<b>21</b>	5,46	0,58	4,98	0,07	2,79	0,22	2,58	0,16
<b>22</b>	5,38	0,72	3,92	0,39	3,92	0,39	4,36	0,44
<b>23</b>	5,82	0,11	5,55	0,00	2,15	0,01	3,20	0,37
<b>24</b>	5,56	1,33	5,84	1,56	2,72	0,10	4,03	0,71

<b>26</b>	6,58	1,18	4,59	0,31	2,08	0,32	3,30	1,11
<b>27</b>	11,18	0,00	3,23	0,60	2,77	0,38	2,19	0,17
<b>28</b>	7,35	1,23	3,37	0,43	2,61	0,04	3,72	0,23
<b>29</b>	6,36	2,24	5,37	0,79	2,42	0,19	3,62	0,14
<b>30</b>	4,96	0,24	4,89	0,76	2,55	0,10	2,36	0,28
<b>31</b>	3,64	0,33	5,05	0,67	1,97	0,23	4,46	0,06
<b>32</b>	4,19	0,07	2,67	0,05	1,93	0,02	3,39	0,62
<b>33</b>	3,89	0,87	5,26	1,09	2,76	0,32	3,26	0,59
<b>34</b>	3,40	0,30	3,20	0,37	2,38	0,31	3,19	0,38
<b>35</b>	2,67	0,19	2,15	0,11	2,57	0,22	2,74	0,27
<b>MITTELWERT</b>	<b>4,33</b>	0,61	<b>5,23</b>	0,58	<b>2,92</b>	0,23	<b>3,50</b>	0,40

## 2. Humanstudie

<b>GSH</b>					<b>GSSG</b>			
	1.BE	2.BE	3.BE	4.BE	1.BE	2.BE	3.BE	4.BE
<b>1</b>	764,0	810,3	804,6	872,1	53,5	48,1	64,2	52,4
<b>2</b>	723,8	672,1	683,3	732,6	84,3	100,7	64,6	47,1
<b>3</b>	814,6	812,1	889,6	943,5	123,7	107,5	96,7	94,5
<b>4</b>	897,6	849,7	741,3	737,9	68,4	65,7	89,5	83,5
<b>5</b>	752,9	831,1	826,0	721,1	79,2	60,4	64,1	83,3
<b>6</b>	1022,1	1030,5	946,6	903,0	70,5	72,5	72,6	70,7
<b>7</b>	853,2	903,6	795,8	823,1	78,3	67,0	67,4	67,6
<b>8</b>	707,1	660,7	761,5	620,9	68,3	81,0	71,2	76,3
<b>9</b>	994,2	858,3	958,8	871,2	66,3	76,8	62,8	68,0
<b>10</b>	780,8	691,5	785,0	627,0	66,5	96,2	69,4	76,1
<b>11</b>	930,0	843,0	983,0	884,7	89,3	80,6	82,2	94,6
<b>12</b>	804,2	828,3	1029,8	826,0	83,8	90,8	77,0	100,5
<b>14</b>	539,4	601,7	613,7	552,8	99,4	85,0	80,6	102,0
<b>15</b>	1154,1	1117,1	976,4	1003,8	96,2	101,3	125,6	109,3
<b>16</b>	802,7	801,9	876,2	832,3	90,9	100,2	97,8	97,2
<b>17</b>	948,7	829,0	989,8	862,3	86,9	97,6	89,4	100,9
<b>18</b>	769,2	815,8	721,0	871,6	96,9	99,0	117,5	92,1
<b>19</b>	799,4	841,1	988,1	824,9	82,2	79,5	78,4	79,4
<b>20</b>	989,9	1009,2	1027,2	808,6	75,2	77,5	96,3	88,9
<b>21</b>	1066,2	1052,9	1022,5	1013,4	79,2	103,6	105,6	88,1
<b>22</b>	952,8	916,2	718,4	839,8	63,3	60,4	93,7	63,0
<b>23</b>	679,7	811,9	681,6	758,5	67,7	57,4	70,4	72,8
<b>24</b>	709,9	824,5	698,6	660,6	60,2	49,7	65,5	61,1
<b>26</b>	724,9	734,3	718,2	717,1	68,5	68,0	62,6	65,5
<b>27</b>	998,3	909,3	1186,7	1049,4	72,0	96,2	75,5	66,0
<b>28</b>	681,5	753,4	893,8	753,4	79,5	65,3	71,4	90,9
<b>29</b>	596,9	522,1	648,2	563,2	60,6	62,1	55,7	61,4
<b>30</b>	991,1	706,0	907,3	810,3	78,2	98,9	94,4	66,1
<b>31</b>	832,1	753,0	889,8	892,1	74,3	90,6	69,5	69,6
<b>32</b>	1034,7	893,3	1087,0	970,2	59,2	72,8	65,9	70,9
<b>33</b>	705,8	770,2	797,1	786,0	72,9	82,9	72,2	69,1
<b>34</b>	762,5	656,9	755,9	752,6	69,0	65,9	72,2	69,4
<b>35</b>	996,3	957,3	1139,8	1076,5	83,3	87,0	76,9	71,6
<b>MITTEL</b>	<b>841,8</b>	<b>820,2</b>	<b>864,9</b>	<b>817,0</b>	<b>77,2</b>	<b>80,3</b>	<b>79,3</b>	<b>77,9</b>
<b>SD</b>	<b>110,2</b>	<b>102,2</b>	<b>113,3</b>	<b>120,7</b>	<b>17,5</b>	<b>19,2</b>	<b>21,0</b>	<b>21,9</b>

## Alle PRODI Daten gemittelt, 33 Probanden

		1.WO	Kaffee	2.WO	Normal
<b>Kcal</b>					
mittel		<b>2200,4</b>	<b>1877,5</b>	<b>2035,3</b>	<b>2031,1</b>
SD		437,8	480,1	557,4	525,9
DACH	2900	<b>75,9</b>	<b>64,7</b>	<b>70,2</b>	<b>69,7</b>
	SD	15,1	16,6	19,2	<b>17,7</b>
1.BE					
1.BE Mittel					
SD					
<b>Eiweiß</b>					
mittel		<b>86,2</b>	<b>77,2</b>	<b>79,4</b>	<b>76,56</b>
SD		16,8	18,9	20,9	14,97
DACH	86,3 g	<b>99,8</b>	<b>89,4</b>	<b>92,0</b>	<b>88,7</b>
	SD	19,5	21,9	24,2	17,2
1.BE					
1.BE Mittel					
<b>KH</b>					
mittel		<b>242,9</b>	<b>210,8</b>	<b>231,5</b>	<b>227,9</b>
SD		64,6	65,5	76,5	77,8
DACH	397 g	<b>61,2</b>	<b>53,1</b>	<b>58,3</b>	<b>57,2</b>
	SD	16,3	16,5	19,3	19,4
1.BE					
1.BE Mittel					
<b>Fett</b>					
mittel		<b>89,13</b>	<b>73,59</b>	<b>79,37</b>	<b>79,87</b>
SD		23,05	22,23	21,65	22,68
DACH	93,5 g	<b>95,3</b>	<b>78,7</b>	<b>84,9</b>	<b>84,9</b>
	SD	24,7	23,8	23,2	23,1
1.BE					
1.Be mittel					
<b>Vit E Aktivität</b>					
mittel		<b>4,6</b>	<b>4,2</b>	<b>5,1</b>	<b>4,8</b>
SD		1,8	2,3	3,1	3,1
DACH	14mg	<b>32,8</b>	<b>30,2</b>	<b>36,5</b>	<b>34,4</b>
	SD	12,8	16,6	22,2	21,9
<b>Vit B2</b>					
mittel		<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>
SD		0,3	0,3	0,3	0,42
DACH	1,4mg	<b>70,5</b>	<b>56,3</b>	<b>58,3</b>	<b>59,26</b>
	SD	23,5	20,9	22,9	30,2
<b>Vit B1</b>					
mittel		<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>

SD		0,3	0,3	0,4	0,41
DACH	1,2mg	<b>90,0</b>	<b>71,0</b>	<b>69,1</b>	<b>73,9</b>
	SD	22,8	26,0	30,4	34,1
<b>Vit B6</b>					
mittel		<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>
SD		0,4	0,4	0,4	0,58
DACH	1,5mg	<b>85,2</b>	<b>73,9</b>	<b>72,6</b>	<b>74,4</b>
	SD	24,0	24,9	27,4	39,0
<b>Vit C</b>					
mittel		<b>44,7</b>	<b>42,8</b>	<b>44,3</b>	<b>55,7</b>
SD		18,3	24,7	25,9	53,2
DACH	100mg	<b>44,7</b>	<b>42,8</b>	<b>44,3</b>	<b>55,7</b>
	SD	18,3	24,7	25,9	53,2
<b>Vit D</b>					
mittel		<b>1,8</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>
SD		1,7	1,1	0,9	1,3
DACH	5µg	<b>35,6</b>	<b>22,8</b>	<b>23,3</b>	<b>21,0</b>
	SD	33,9	21,7	18,6	26,6
<b>Folsäure</b>					
mittel		<b>126,41</b>	<b>115,57</b>	<b>130,14</b>	<b>128,94</b>
sd		41,45	43,97	52,65	83,33
DACH	400 µg	<b>31,6</b>	<b>28,9</b>	<b>32,5</b>	<b>32,2</b>
	SD	10,4	11,0	13,2	20,8
<b>Vit A, Retinol aqv.</b>					
mittel		<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>
sd		0,4	0,5	0,4	0,5
DACH	1mg	<b>37,2</b>	<b>46,7</b>	<b>44,2</b>	<b>34,1</b>
	SD	40,4	51,8	37,7	48,9

## **11.3 Lebenslauf**

### **PERSÖNLICHES**

---

Tamara Bakuradze  
geboren am 12.09.1971 in Tbilisi/Georgien  
verheiratet, 1 Sohn

### **SCHULAUSBILDUNG**

---

1977 - 1988	Mittelschule N160 Tbilisi/Georgien
1988	Mittlere Reife

### **STUDIUM**

---

1988 - 1993	Georgische Agraruniversität Tbilisi/Georgien Fachrichtung Lebensmitteltechnologie
1993	Abschluss des Studienganges Diplom- Ingenieur Technologin mit Auszeichnung
1994-1997	Aspiranturstudium am georgischen landwirtschaftlichen Forschungsinstitut
WS 98 - SS 99	Sprachkurs für Deutsche Sprache, Universität Kaiserslautern
07/1999	Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang ausländischer Studienbewerber (DSH) bestanden
seit 2000	Studium an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
04/2000 - 10/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft Universität Kaiserslautern Fachbereich Mathematik
09.2005	Erste Staatsexamen. Gesamtnote „sehr gut“
01.10.2005-31.03.06	Diplomarbeit mit dem Thema: „Proteincarbonyle als Marker für ROS abhängige Proteinveränderungen: Nachweis und Modulation durch Oxidantien“ im Betreuung durch: Frau Dr. C. Janzowski ;

AK Prof. G. Eisenbrand  
Abschluss 1.3 (sehr gut)

05/2006 – 09/2009      Promotion als wissenschaftliche Angestellte bei Herrn Prof. Dr. Eisenbrand am Fachbereich Chemie. Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie. Technische Universität Kaiserslautern: „Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeinhaltsstoffen/-extrakten und Kaffeegetränken *in vitro* und bei Probanden

### **Zusatzqualifikationen**

Seit 2007 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT):

- Molekulare Zelltoxikologie
- Tierversuchskunde I (theoretischer Teil) und Biostatistik
- Tierversuchskunde II (praktischer Teil)
- Lebensmitteltoxikologie
- Grundlagen der Organotoxikologie und –pathologie I
- Grundlagen der Epidemiologie

### **Administrative Aufgaben**

Betreuung von Seminararbeiten mit Themen der Lebensmittelchemie und –toxikologie:

- Simone Rohner: Cumarin – Physiologische Wirkung und Toxikologie
- Meike Ochs: Gesund durch Kaffee
- Andreas Rau: Schokolade – Chemie, Technologie, polyphenolische Inhaltsstoffe, gesundheitliche Bewertung
- Tamara Schauß: Taurin und Glucuronolacton – Charakterisierung zweier Bestandteile von Energy Drinks

Betreuung und Koordination der Arbeit von Forschungspraktikanten, Diplomanden und Laboranten; Beurteilung der Arbeiten:

Diplomanden

- Meike Ochs: *In vitro* Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von Kaffeeinhaltsstoffen

- Nicole Hohn: *In vitro* Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Kaffeeextrakte und -inhaltsstoffen



## **Posterbeiträge und Publikationen**

### **Posterbeiträge:**

6<sup>th</sup> Symposium of the DFG-Senate Commission on Food Safety (SKLM),  
Kaiserslautern 30.03.2009 -01.04.2009

T. Bakuradze, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski; Coffee and coffee compounds are effective antioxidants in human cells and *in vivo*

38. Deutschen Lebensmittelchemikertag. Berlin. 14.-16. September 2009

T. Bakuradze, M. Baum, G. Eisenbrand und C. Janzowski; Kaffee und Kaffeeinhaltsstoffe sind effektive Antioxidantien in humanen Zelllinien und *in-vivo*

4<sup>th</sup> International Conference of Polyphenols and Health (ICPH 2009). Harrogate, England, 6. -13. 12. 2009

T. Bakuradze, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski; Coffee and coffee compounds are effective antioxidants in human cells and *in vivo*

Regionalverbandstagung 2010, 08.-09. März 2010 in Erlangen

Bakuradze, T., Böhm, N., Baum, M., Eisenbrand, G. und Janzowski, C., Antioxidative Wirksamkeit von Kaffee in einer Interventionsstudie mit Probanden

### **Publikationen**

T. Bakuradze, R. Lang, T. Hofmann, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski  
Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell free systems and human colon cell lines; *in Vorbereitung*

möchte ich mich besonders bedanken für die einmalige Chance eine humane Interventionsstudie zu organisieren und durchzuführen, dass hat mir sehr gefordert und war genau mein Ding.

Weiterhin möchte ich DANKEN....

...allen, die auf ihre Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und v.a. denen, die ich trotz intensivsten Nachdenken doch hier vergessen habe.

...Frau Janzowski für ALLES, für die Unterstützung, die vielen fachlichen Anregungen und neue Erfahrungen während meiner Promotionszeit.

...dem BMBF für die finanzielle Unterstützung sowie allen Netzwerkpartnern für die Durchführung der ein oder anderen Biomarkeruntersuchung. AG Hofmann und AG Eggers für die Bereitstellung der Kaffeeproben sowie der AG Somoza (DFA Garching) für die Bereitstellung der Blutproben.

...den zwei treuen Seelen Ingrid und Heike im Sekretariat, die bei Problemen immer für mich da waren.

...meiner Lieblings TA Sylvia, für die unschätzbare Unterstützung.

. Arbeitskreis Richling und Schrenk für die Unterstützung während der Studie.

...der Ärztin Natalie Knorr sowie Prof. F.W. Albert vom Westfalzklinikum Kaiserslautern, ohne die ich nicht an das Blut der Probanden heran gekommen wäre!

...Eva und Reiner für Hilfe bei allem und die nette Gesellschaft in Kaffeezimmer und Labor.

...Ari für seine stetige Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen und das gemeinsame Lösen von unendlichen Computerschwierigkeiten des Arbeitskreises.

...Philliph, für seine nette Gesellschaft im Labor, stetige Bereitschaft für Blutentnahmen und große Hilfe während der Studie

...Hannah, Steffi und Claudia S. für eure Geduld während der Korrekturarbeiten.

...Bülent, für deinen netten Art, für deine Unterstützung während der Studie.

...Stefan, für deine Hilfe und Geduld während der PRODI Auswertung!

...Julia, Franz, Nadine für eure Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

...den Diplomanden Meike und Nicole, den HiWis Simone und Andreas.

...Herrn Stockis für seine unermüdliche Bereitschaft mich in statistischen Fragen zu beraten und unglaubliche mathematische Operationen durchzuführen.

....Jina, Tania, Sarah

...den anderen Arbeitskreismitgliedern für ihre Hilfe bei Problemen

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, besonders aber meinem Gigi und Otar.